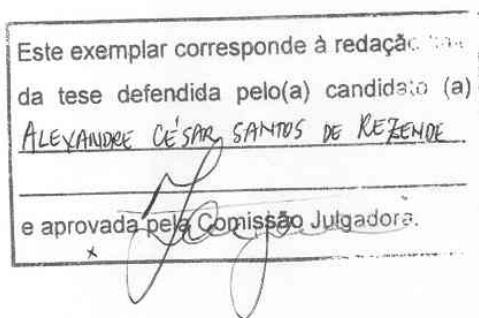




# **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**ALEXANDRE CÉSAR SANTOS DE REZENDE**

**Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e  
Tat-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos  
após axotomia periférica**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone**

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**R339e**

**Rezende, Alexandre César Santos de**

Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e Tat-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos após axotomia periférica / Alexandre César Santos de Rezende. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

**Orientador: Francesco Langone.**

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Neurônios motores. 2. Ratos neonatos. 3. CNTF. 4. Axotomia.
5. Neurodegeneração. 6. Fatores neurotróficos. 7. Morte neuronal.
- I. Francesco Langone. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Campinas, 10 de março de 2005.

**BANCA EXAMINADORA**

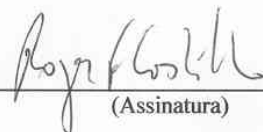
Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)

  
(Assinatura)

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

  
(Assinatura)

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

  
(Assinatura)

Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo

  
(Assinatura)

*“Toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.*

Albert Einstein (1879 – 1955)

A minha esposa Simone

O seu amor, paciência e companheirismo foram de grande importância para o meu crescimento profissional e pessoal. Pela sua dedicação e cuidado, meus sinceros agradecimentos e meu eterno amor.

A minha mãe, Vanda

Pelo seu amor e por ser minha mãe. O seu exemplo de vida e sua força sempre foram os alicerces da minha vida. Tantas foram às lutas que a senhora teve que enfrentar para que eu conseguisse chegar até aqui. A senhora foi, é e sempre será o maior presente que Deus poderia me dar. O meu eterno amor e gratidão.

Ao meu pai, Carlos

Embora não esteja aqui presente, o senhor foi meu grande incentivador e com certeza uns dos responsáveis por esta conquista. Ao senhor meu eterno amor, saudade e gratidão.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre me abençoando e me ajudando a realizar os sonhos mais importantes da minha vida.

A minha esposa Simone por ser minha amada companheira nos bons e maus momentos e por ser uma presença ativa nas minhas conquistas.

A minha mãe Vanda que sempre esteve ao meu lado, muito obrigado pelas orações, pelo incentivo e por ser a minha mãe. E a toda minha família que sempre torceu por mim.

Ao meu sogro e minha sogra Édson e Marilu, pela confiança, pelos conselhos e pelas orações. Os seus exemplos de vida contribuíram em muito para o meu crescimento como pessoa. A vocês, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Francesco Langone, pela sua paciência, dedicação e honestidade nos ensinamentos no decorrer do trabalho. Sem dúvida, meu aprendizado não ficou apenas no meio acadêmico, mais sim em experiência para toda a minha vida. Agradeço de modo especial por ser meu orientador e acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro Negro, pela confiança e pelo fornecimento das moléculas testadas neste trabalho.

A Líliam A.S. Panagio pela sua competência e prontidão em resolver todos os problemas burocráticos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, meu muito obrigado.



Ao meu amigo Fábio Rogério pela sua ajuda nas reações e análises imunoistoquímicas, no inglês e análises dos resultados da tese, meu sincero agradecimento. E aos meus amigos do Laboratório de Neurobiologia: Débora, César, Cristiane, Fernanda Pelágio, André Nascimento, Rafael, Fernanda Hussein, Gustavo e André, pela amizade e pela ajuda no andamento do trabalho.

Ao amigo do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Adriano e ao técnico Juvani, pela ajuda no processamento e cortes histológicos em historesina que de fato foi de grande importância para o fechamento dos resultados deste trabalho.

A Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho e ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo, por aceitarem compor a banca e pelas observações na Pré-Banca, que com certeza foram de extrema importância para o término da tese.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Minha gratidão.

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	14
3.1. Animais e grupos experimentais	14
3.2. Procedência e caracterização do CNTF e TAT-CNTF	15
3.3. Procedimentos cirúrgicos para a secção do nervo ciático e tratamento	15
3.4. Avaliação do peso corporal	16
3.5. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes	17
3.6. Análise quantitativa	17
3.7. Análise imunoistoquímica	18
3.8. Processamento e análise da gordura marrom	19
<b>4. RESULTADOS</b>	21
4.1. Efeito dos tratamentos sobre o Índice de Sobrevivência Neuronal (ISN)	21
4.2. Avaliação imunoistoquímica	27
4.3. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento ponderal dos animais	32
4.4. Avaliação da gordura marrom interescapular	32
<b>5. DISCUSSÃO</b>	38
<b>6. CONCLUSÕES</b>	50
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51

## RESUMO

A investigação de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas recebeu um grande impulso nas últimas décadas, em virtude do desenvolvimento de técnicas que permitiram a clonagem de moléculas com reconhecida ação neurotrófica. O emprego de modelos experimentais para o estudo de processos neurodegenerativos contribuiu significativamente ao conhecimento dos mecanismos de ação e especificidade dessas moléculas. O fator neurotrófico ciliar (CNTF) despertou grande interesse com a descoberta do seu efeito neuroprotetor sobre motoneurônios após secção de nervos periféricos em ratos neonatos e camundongos adultos. Contudo, os testes clínicos em pacientes com esclerose lateral amiotrófica revelaram efeitos colaterais importantes associados às diferentes doses e esquemas de tratamento com CNTF recombinante humano. Estes resultados tiveram como consequência a interrupção dos testes clínicos e estimularam a busca de vias alternativas para a administração do CNTF com o objetivo de eliminar os efeitos colaterais indesejáveis. Uma via alternativa muito promissora parece ser a administração do CNTF conjugado com peptídeos que possuem domínio de transdução ou translocação de proteínas (PTD-*protein transduction domain*). Neste estudo investigamos o efeito do CNTF conjugado com um PTD derivado do vírus HIV-1 (Tat-CNTF) quando administrado a ratos neonatos (P2) após secção do nervo ciático. Um grupo de ratos (Wistar) teve o nervo ciático esquerdo seccionado e recebeu um fragmento de gelfoam embebido em CNTF (6µg), Tat-CNTF (6µg ou 3µg) ou PBS. Outro grupo sofreu o mesmo tipo de lesão e foi tratado diariamente, durante 5 dias, com doses subcutâneas de CNTF (1,2µg/g), Tat-CNTF (1,2, 0,6 ou 0,3µg/g) ou PBS. O peso corporal foi registrado diariamente entre P2 e P7. Na idade de P7 os animais foram perfundidos (paraformaldeído 4%) e a medula lombar foi embebida em parafina para obtenção de cortes seriais transversais. Os cortes foram corados com cresil violeta e os motoneurônios do grupamento ventrolateral de ambos os lados foram contados. A razão entre o número de motoneurônios do lado lesado e do lado íntegro correspondeu ao índice de sobrevivência neuronal (ISN). Uma série de 9 cortes de cada animal foi reagida para investigação imunoistoquímica da expressão de GFAP pelos astrócitos. Nossos resultados mostraram que o ISN de todos os grupos tratados com Tat-CNTF, local e subcutaneamente, foi similar aos dos grupos tratados da mesma forma com CNTF e maior que nos grupos tratados com PBS. O acompanhamento do ganho de peso dos animais entre P2 e P7 mostrou que aqueles que receberam tratamento local com CNTF ou Tat-CNTF apresentaram crescimento semelhante ao do observado nos animais do grupo controle. Por outro lado, a curva de crescimento dos animais tratados com doses subcutâneas diárias de CNTF (1,2µg/g), revelou que estes tiveram ganho de peso significativamente inferior ao dos animais tratados com a mesma dose, ou com as doses inferiores, de Tat-CNTF. O menor crescimento dos animais tratados com CNTF foi significativo a partir do segundo dia de tratamento. Na idade P7 o peso corporal desses animais foi 25% e 30% inferior aos dos animais tratados com Tat-CNTF e aos animais controle, respectivamente. Não houve diferença significativa de ganho de peso entre os animais tratados com as diferentes doses de Tat-CNTF e os animais tratados com PBS subcutaneamente. Além disso, a administração subcutânea de CNTF provocou intensa mobilização da gordura marrom interescapular, fenômeno não verificado nos animais tratados com Tat-CNTF. Os dados da análise imunoistoquímica para GFAP revelaram que a resposta astrogliar nos animais tratados com Tat-CNTF foi menos intensa que a observada nos animais que receberam tratamento subcutâneo com CNTF. Nossos resultados revelaram que a Tat-CNTF além de possuir ação neuroprotetora não produziu os efeitos colaterais indesejáveis do CNTF, mesmo quando administrado em dose igual à deste último. Estes dados suportam a hipótese que a adição do domínio PTD a moléculas neurotróficas é uma estratégia de neuroproteção eficaz e abre perspectivas para possível emprego da Tat-CNTF em moléstias neurodegenerativas que afetam os motoneurônios espinhais, tais como a esclerose lateral amiotrófica.

## ABSTRACT

The investigation of therapeutical agents for the treatment of neurodegenerative diseases and neurotrauma received a great attention in the last decades due to cloning techniques for neurotrophic molecules. Experimental models contributed to the knowledge of the mechanisms of action and specificity of such molecules. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is known as a neuroprotective agent on motoneurons after peripheral nerve section in neonatal rats and adult mice. However, clinical trials with human recombinant CNTF showed dose dependent-side effects. Consequently, new approaches for avoiding those side effects have been investigated, such as CNTF fused with domain transduction protein (PTD). In the present work, we studied the effects of CNTF fused with the PTD of the HIV-1 (Tat-CNTF) in neonatal rats (P2) after sciatic nerve transection. Wistar rats had their left sciatic nerve cut and embedded in gelfoam with either CNTF (6 $\mu$ g), Tat-CNTF (6 $\mu$ g or 3 $\mu$ g) or PBS. Other lesioned rats were treated subcutaneously with either CNTF (1.2 $\mu$ g/gr), Tat-CNTF (1.2, 0.6 or 0.3 $\mu$ g/gr) or PBS, once a day, for 5 days. The body weight was registered from P2 to P7. At P7 the rats were perfused (4% paraformaldehyde) and the lumbar spinal cord was infiltrated with paraffin. Serial transverse sections were stained with cresyl violet and used for ventrolateral motoneuron counting. The ratio between the number of motoneurons counted in the operated and control sides was defined as neuronal survival ratio (NSR). From each animal, a series of nine sections was used for immunohistochemical detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed by astrocytes. The animals that received either local or subcutaneous Tat-CNTF showed NSR similar to those observed in CNTF groups and higher than the registered in the controls (PBS). Body weight of rats from P2 to P7 treated with a local dose of CNTF or Tat-CNTF was similar to that of the control groups. On the other hand, rats treated with subcutaneous daily doses of CNTF had lower body weight than the observed in the other groups. Animals treated with CNTF had lower weight gain from the second day on. At P7 the body weight of CNTF treated animals was 25% and 30% lower than those receiving Tat-CNTF and PBS, respectively. The animals treated with different subcutaneous doses of Tat-CNTF had similar body growth as the control groups. Moreover, only subcutaneous administration of CNTF led to fat mobilization from the intrascapular brown adipose tissue. Immunostaining for GFAP showed that astrocytic response was less intense after Tat-CNTF administration in comparison with subcutaneous treatment with CNTF. Our results showed that Tat-CNTF is a neuroprotective agent not associated with the side effects attributed to CNTF, even when administered in similar doses. These data support the hypothesis that the addition of PTD to neurotrophic molecules is an efficient neuroprotective strategy and opens up perspectives for using Tat-CNTF in neurodegenerative diseases that affect the spinal motoneurons, such as the amyotrophic lateral sclerosis.

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas recebeu um grande impulso nas últimas décadas em virtude do desenvolvimento de técnicas que permitiram a clonagem de moléculas com reconhecida ação neurotrófica (Moris e Vega, 2003). Paralelamente, o emprego de modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, para o estudo de processos neurodegenerativos contribuíram significativamente ao conhecimento dos mecanismos de ação e especificidade dessas moléculas (Vantini e Skaper, 1992; DiStefano, 1993; Lindsay e cols., 1994; Riggs, 1995; Blesch e cols., 1998; Neuhaus e cols., 2003; Pradat, 2003; Salehi e cols., 2003).

Os trabalhos pioneiros de Rita Levi-Montalcini (1964) e a descoberta de novos fatores neurotróficos revelaram que populações diferentes de neurônios são sensíveis a moléculas neurotróficas diferentes. Este conhecimento permitiu também compreender melhor as causas da eliminação de grande número dos neurônios gerados durante a embriogênese (Kuno, 1990; Oppenheim, 1991; Korsching, 1993; Gordon, 1995; Levi-Montalcini, 2000; Bennet e cols., 2002). Em particular, diversos laboratórios obtiveram evidências de que a eliminação de aproximadamente 50% dos neurônios motores, sensitivos e interneurônios espinhais gerados durante a embriogênese seja decorrente, em grande parte, da competição dessas células pelos fatores neurotróficos produzidos por seus respectivos alvos (Kashihara e cols., 1987; Kuno, 1990; Sendtner e cols., 1990; Oppenheim, 1991; Lowrie e Vrbová, 1992; Deckwerth e Johnson, 1993; Johnson e Deckwerth, 1993; Greensmith e Vrbová, 1996; Pettmann e Henderson, 1998; Whiteside e cols., 1998; Oliveira e cols., 1997; Sendtner, 2000; Beck, 2001; Oliveira e cols., 2002).

De acordo com estudos prévios, é interessante notar que durante a primeira semana após o nascimento, os neurônios motores e sensitivos de ratos e camundongos são particularmente vulneráveis à lesão axonal. Por exemplo, a secção do nervo ciático de ratos no dia do nascimento (P0) leva à morte de aproximadamente 75% dos neurônios sensitivos e de praticamente 100% dos motoneurônios atingidos. A morte neuronal pode ser notada poucas horas após a lesão e acentua-se gradativamente no decorrer dos dias. Contudo, essa vulnerabilidade à axotomia diminui com a idade do animal, ou seja, pode não mais se manifestar nos motoneurônios de animais adultos quando a lesão é produzida relativamente distante do corpo celular (Schmalbruch, 1984,1987a,1987b,1988,1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Lowrie e cols., 1994).

Acredita-se que uma possível causa da morte neuronal, induzida pela axotomia durante a primeira semana de vida, seja a grande dependência que estas células - ainda imaturas - tenham dos fatores neurotróficos fornecidos pelo seu respectivo território de inervação. Além disso, durante esse período as células não neurais do nervo, especialmente as células de Schwann, seriam ainda incapazes de prover quantidades adequadas de fatores neurotróficos aos neurônios axotomizados, como ocorre na idade adulta. Embora os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestes fenômenos ainda não estejam esclarecidos, esta hipótese tem sido corroborada por observações de diferentes laboratórios (Kashihara e cols., 1987; Kuno, 1990; Sendtner e cols., 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Sendtner e cols., 1992a,b; Yan e cols., 1993; Funakoshi e cols., 1993; Friedman e cols., 1995; Greensmith e Vrbová, 1996; Lowrie e Lawson, 2000; Oliveira e cols., 2002).

Sabe-se também que a administração de fatores neurotróficos aos nervos periféricos lesados reduz significativamente a morte de diferentes populações de neurônios, quer em animais neonatos, quer em animais adultos (Da-Silva e Langone, 1989; Sendtner e cols., 1992a,b; Yan e cols., 1992; Ip e Yancopoulos, 1995; Ip e Yancopoulos, 1996; Vejsada e cols., 1995; Lewin e Barde, 1996; Semkova e Krieglstein, 1999; Yuan e cols., 2000; Oliveira e cols., 2002). Interessantemente, trabalhos recentes mostraram que a lesão do nervo ciático em ratos, além de provocar a morte dos motoneurônios e dos neurônios sensitivos diretamente afetados pela axotomia, causa também a morte de populações de interneurônios espinhais (Oliveira e cols., 1997; Whiteside e cols., 1998; Oliveira e cols., 2002). Dentro deste contexto, é importante destacar que a morte de neurônios espinhais após axotomia em ratos neonatos parece ocorrer por apoptose, de maneira semelhante ao que se observa durante o desenvolvimento (Oppenheim, 1991; Pettmann e Henderson, 1998; Lawson e Lowrie, 1998; Oliveira e cols., 2002).

Corroborando as hipóteses referidas acima, recentemente Oliveira e cols., (2002) mostraram que a aplicação local do fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico ciliar (CNTF) sobre o coto proximal do nervo ciático de ratos neonatos reduziu significativamente o número de neurônios motores, sensitivos e interneurônios apoptóticos. Além disso, o efeito neuroprotetor seletivo do NGF e do CNTF sobre neurônios sensoriais e neurônios motores, respectivamente, manifestou-se também sobre diferentes populações de interneurônios distribuídos nas lâminas de Rexed. Este dado sugeriu que os interneurônios são troficamente dependentes de seus neurônios alvo e

aferentes específicos, e que a aplicação local de fatores neurotróficos sobre nervo lesado pode contribuir para manutenção dos circuitos espinhais.

Os fatores neurotróficos podem ser agrupados em classes segundo sua estrutura molecular e tipos de receptores de membrana. Uma das classes é a das neurotrofinas, cujo protótipo é o NGF encontram-se outras proteínas, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5), que atuam sobre diferentes populações de neurônios sensitivos e motores através do receptor p75 e dos receptores de membrana da família tirosina quinase TrkA, TrkB e TrkC (Barbacid, 1994; Bothwell, 1995; Chao, 2003). Por sua vez, na classe das neuroquinas ou neuropoetinas, encontram-se o CNTF e o fator inibidor de leucemia (LIF), moléculas altamente relacionadas com as citocinas, e a própria interleucina 6 (IL-6). Estas atuam sobre diferentes populações de neurônios através de receptores localizados na membrana plasmática e formados por três subunidades, dentre as quais está sempre presente a subunidade gp130 (Stalh e Yancopoulos, 1994; Inoue e cols., 1996; Ip e Yancopoulos, 1996).

O CNTF foi inicialmente identificado como um fator capaz de garantir a sobrevivência de neurônios parassimpáticos do gânglio ciliar de pintainho (Varon e cols., 1979). Posteriormente, o estudo da sua expressão, purificação e clonagem foi realizado por diferentes autores (Barbin e cols., 1984; Manthorpe e cols., 1986; Stockli e cols., 1989; Lin e cols., 1989; Negro e cols., 1991a,b). Atualmente sabe-se que o CNTF é produzido por células de Schwann associadas a fibras mielínicas e por subpopulações de astrócitos, sendo amplamente distribuído no sistema nervoso central (Stockli e cols., 1991; Friedman e cols.,



1992; Rende e cols., 1992; Henderson e cols., 1994b; Kirch e Hofmann, 1994; Richardson, 1994). Além disso, essa molécula é capaz de promover a sobrevivência de uma variedade de populações de células nervosas e de atuar na proliferação e diferenciação de células gliais no sistema nervoso central durante o desenvolvimento (Hughes e cols., 1988; Lillien e Raff, 1990; Lillien e cols., 1990; Stockli e cols., 1991).

Ao longo dos últimos anos foram obtidas diversas evidências que reforçam a hipótese de que o CNTF desempenhe um papel importante na resposta do tecido nervoso à lesão (Thoenen, 1991; Sendtner e cols., 1997). Neste sentido, observou-se que após lesões no sistema nervoso central ou periférico são desencadeadas dramáticas alterações nos níveis de CNTF nas regiões afetadas. Lesões mecânicas provocadas no cérebro, por exemplo, levam a um expressivo aumento na quantidade de mRNA para CNTF bem como da própria proteína no local lesionado (Ip e cols., 1993; Asada e cols., 1995). Interessantemente, este aumento na expressão do mRNA para CNTF foi localizado em astrócitos reativos presentes no tecido cicatricial originado no local da lesão (Rudge e cols., 1992; Ip e cols., 1993; Henderson e cols., 1994b; Asada e cols., 1995). Desta forma, é possível que o CNTF tenha uma dupla função no processo pós-lesional, atuando como molécula trófica para os neurônios e como estimulador de resposta glial (Rudge e cols., 1992; Winter e cols., 1995; Dallner e cols., 2002).

No sistema nervoso periférico íntegro são detectados altos níveis de mRNA para CNTF e desta proteína no citoplasma das células de Schwann (Stockli e cols., 1991; Rende e cols., 1992; Friedmann e cols., 1992). Porém, após uma lesão traumática os níveis de mRNA para CNTF diminuem drasticamente no coto distal e aumenta a quantidade desta

proteína no espaço extracelular (Smith e cols., 1993). Desta forma, acredita-se que o CNTF estocado nas células de Schwann seja abundantemente liberado em resposta à lesão para atuar como um agente neuroprotetor rápido (Friedman e cols., 1992; Sendtner e cols., 1992c; Smith e cols., 1993). Têm-se também evidências que o CNTF possa ser internalizado e retrogradamente transportado pelos axônios até o corpo celular após uma lesão nervosa periférica, assim como outros fatores neurotróficos (Sendtner e cols., 1990; Curtis e cols., 1993; Curtis e DiStefano, 1994). É interessante notar que as células de Schwann passam a expressar novamente CNTF à medida que estabelecem contato e iniciam a mielinização dos axônios em regeneração (Sendtner e cols., 1992c; Lee e cols., 1995). A sinalização molecular responsável por esse processo ainda permanece desconhecida (Friedman e cols., 1999).

O CNTF despertou grande interesse de diversos laboratórios com a descoberta de seu efeito neuroprotetor sobre motoneurônios após a secção de nervos periféricos em ratos neonatos e em modelos experimentais de neuropatologias motoras (Hagg e cols., 1992; Sendtner e cols., 1990; Sendtner e cols., 1992a,b; Lindsay, 1995; Kuzis e Eckenstein, 1996). Particularmente, Sendtner e cols (1990) demonstraram que a aplicação local de CNTF sobre o coto proximal do nervo facial de ratos recém nascidos impede efetivamente a morte de motoneurônios. Adicionalmente, Sendtner e cols. (1992b) observaram que a injeção intraperitoneal de células geneticamente modificadas para expressar CNTF em camundongos mutantes (*pm/pm*), que desenvolvem uma neuropatia motora progressiva, retardou significativamente a degeneração dos motoneurônios e a manifestação dos sinais clínicos. Esta estratégia experimental empregada por estes autores foi motivada pelo fato do

CNTF apresentar uma vida média plasmática de 2 a 3 minutos e o animal empregado pudesse não suportar repetidas injeções diárias dessa substância (Dittrich e cols., 1994). Trabalhos posteriores investigaram a viabilidade da administração sistêmica do CNTF empregando outros modelos experimentais. Sua ação neurotrófica foi observada, porém, em virtude das doses empregadas, essa ação foi acompanhada de inesperada perda de peso e caquexia (Henderson e cols., 1994a; Kwon e Gurney, 1994; Zhang e cols., 1995).

Não obstante, os efeitos colaterais observados em animais, a ação protetora do CNTF sobre os motoneurônios, confirmada em diversos modelos experimentais de neurotrauma e neurodegeneração, motivou a investigação do possível emprego desse fator neurotrófico no tratamento de doenças neurodegenerativas de seres humanos (Sendtner e cols., 1994).

Na década passada foram realizados testes clínicos em pacientes com esclerose lateral amiotrófica para verificar a toxicidade, a tolerabilidade e a farmacocinética do CNTF (Miller e cols., 1993; Brooks e cols., 1993; Sendtner e cols., 1994; Miller e cols., 1996a,b). O estudo multicêntrico relatado por Miller e cols. (1996b) revelou efeitos colaterais importantes associados às diferentes doses e esquemas de tratamento com CNTF recombinante humano. Particularmente, assim como nos animais, a administração de doses acima de 10µg/kg/dia nesses pacientes produziu anorexia e perda de peso, além de estomatite por herpes labial, tosse, aumento de secreções oral e fadiga.

Estes resultados tiveram como consequência a interrupção dos testes clínicos. Por outro lado, além de revelarem outras funções importantes do CNTF (Espat e cols., 1996; Martin e cols., 1996; Matthys e Billiau, 1997), estimularam a busca de vias alternativas

para a administração do CNTF com o objetivo de eliminar os efeitos colaterais indesejáveis (Tan e cols., 1995; Aebischer e cols., 1996; Penn e cols., 1997; Haase e cols., 1999; Bachoud-Levi e cols., 2000).

Uma via alternativa muito promissora parece ser a administração do CNTF conjugado com peptídeos que possuem um domínio de transdução ou translocação de proteínas (PTD-*protein transduction domain*). Sabe-se que proteínas que possuem esse domínio são capazes de cruzar a membrana celular através de mecanismos independentes de receptores específicos (Schwarze e cols., 1999, 2000; Becker-Hapak e cols., 2001; Dietz e Bähr, 2004).

A transdução ou translocação de proteínas para o interior de células foi descrita independentemente por Green e Loewenstein (1988) e por Frankel e Pabo (1988) com a descoberta que a proteína Tat ( Transcriptional activator of transcription) do vírus HIV poderia atravessar membranas celulares e transativar o genoma viral. Em 1994, Fawell e cols., demonstraram que proteínas heterólogas ligadas a uma sequência de 36 aminoácidos da Tat, contendo o domínio PTD, eram capazes de serem translocadas para o interior de células. Após a descoberta destas propriedades da Tat do HIV, outras proteínas que possuem domínios de transdução foram identificadas: a proteína Antennapedia (Antp) da *Drosophila* (Derossi e cols., 1994) e a proteína HSV VP22 do vírus herpes simples (Elloit e O'Hare, 1997). É importante mencionar que o domínio de translocação originalmente identificado na Tat do HIV não contém material infeccioso (Becker-Hapak e cols., 2001).

Uma grande variedade de tipos de células em cultura, primárias ou transformadas, foi utilizada para estudos de translocação de proteínas ligadas a uma sequência de

aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV (Nagara, 1998; Lissy e cols., 1998, Ho e cols., 2001). Os estudos *in vivo*, mais recentes na sua maioria, geraram dados particularmente importantes no que refere ao possível emprego desta estratégia para fornecer proteínas neurotróficas ao sistema nervoso central com finalidade terapêutica. Foi demonstrado que proteínas relativamente grandes acopladas à sequência PTD da Tat do HIV, são capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e de serem translocadas para o interior de células do tecido nervoso central (Schwarze e cols., 1999; Schwarze e Dowdy, 2000; Cao e cols., 2002; Kilic e cols., 2003). Particularmente, Kilic e cols. (2003) demonstraram, pela primeira vez, que a administração endovenosa de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) acoplado a uma sequência de 11 aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV pode ser uma poderosa estratégia terapêutica de neuroproteção no tratamento da isquemia cerebral focal.

Embora os mecanismos de internalização das proteínas associadas com o PTD da Tat do HIV não estejam ainda completamente elucidados, o grande número de investigações realizadas nos últimos anos forneceu evidências para a proposição de três modelos básicos: i) penetração direta através da porção lipídica da membrana, ii) penetração através da formação de micelas invertidas na membrana e iii) penetração por endocitose. Contudo, os três modelos propostos levam em conta a interação eletrostática não específica do PTD com a porção lipídica da membrana que, uma vez ocorrida, induz o desencadeamento dos mecanismos de internalização. De fato, os aminoácidos arginina (R) e lisina (K) da sequência PTD da Tat (YGRKKRRQRRR) lhe conferem natureza eletropositiva que a capacita interagir com a porção eletronegativa dos lipídios da membrana.

Porém, outro fator que parece ser determinante para internalização de proteínas associadas a Tat-PTD é a interação desta com as glicosaminoglicanas sulfatadas heparan sulfato e heparina (para revisão vide Dietz, 2004).

Recentemente, o laboratório do Prof. Alessandro Negro, do *Centro di Biotecnologie Innovative* (CRIBI) da Universidade de Padova (PD, Itália), acoplou ao CNTF recombinante humano uma sequência de 15 aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV (Tat-CNTF). Experimentos *in vitro* mostraram que esta molécula é capaz de internalizar-se em células de ovário de hamster em cultura (CHO, Chinese Hamster Ovarian Cell) e de exercer ação neurotrófica sobre culturas de neurônios sensoriais de gânglios da raiz dorsal de embrião de galinha (Langone e cols., 2004).

Conforme já considerado, a axotomia produzida pela secção do nervo ciático em animais neonatos induz acentuada morte de motoneurônios e neurônios sensitivos. Pela sua reprodutibilidade este modelo experimental é muito útil para investigar a possível ação neuroprotetora de diferentes moléculas *in vivo* (Vejsada e cols., 1995; Sendtner e cols., 1990, 1992; Yan e cols., 1992; Vergani e cols., 1998; Oliveira e cols., 2002; Rogério e cols., 2002, 2005). Empregando-se esse modelo experimental, o presente estudo representa a primeira investigação *in vivo* dos efeitos da Tat-CNTF administrada local e sistemicamente sobre os motoneurônios axotomizados, com o objetivo de dar subsídios para seu possível emprego no tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas.

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a ação neuroprotetora do CNTF e da Tat-CNTF sobre os neurônios espinhais após a lesão do nervo ciático e os possíveis efeitos colaterais causados por estas moléculas.

### **Os objetivos específicos foram:**

- 1) Avaliar o efeito neurotrófico da administração local de CNTF e Tat-CNTF na sobrevivência de motoneurônios espinhais após a secção do nervo ciático de ratos neonatos (P2).
- 2) Avaliar o efeito neurotrófico da administração subcutânea de CNTF e Tat-CNTF na sobrevivência de motoneurônios espinhais após secção do nervo ciático de ratos neonatos (P2).
- 3) Investigar se o efeito neurotrófico obtido pela administração local ou subcutânea do CNTF na sobrevivência de motoneurônios espinhais, após secção do nervo ciático de ratos neonatos (P2), possa ser produzida por doses inferiores de Tat-CNTF.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e grupos experimentais

Foram empregados ratos Wistar com idade de dois dias (P2) fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos junto à mãe durante todo o período de experimentação, sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C). Foram estabelecidos 9 grupos experimentais, de acordo com tratamento (Tabelas 1 e 2). Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA), e aprovadas pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp (Proc.509/1).

TABELA 1: Animais que receberam tratamento local

GRUPOS	LESÃO	TRATAMENTO				Duração do Tratamento	Sobrevivência após lesão
		CNTF Local 6µg	Tat-CNTF Local 6µg	Tat-CNTF Local 3µg	PBS (0,1M) Local		
1 (n=7)	X	X				5 dias	5 dias
2 (n=7)	X		X			5 dias	5 dias
3 (n=6)	X			X		5 dias	5 dias
4 (n=5)	X				X	5 dias	5 dias

TABELA 2: Animais que receberam tratamento subcutâneo

GRUPOS	LESÃO	TRATAMENTO					Duração do Tratamento	Sobrevivência após lesão
		CNTF Subcutâneo 1,2µg/gr/dia	Tat-CNTF Subcutâneo 1,2µg/gr/dia	Tat-CNTF Subcutâneo 0,6µg/gr/dia	Tat-CNTF Subcutâneo 0,3µg/gr/dia	PBS (0,1M) Subcutâneo		
5 (n=5)	X	X					5 dias	5 dias
6 (n=5)	X		X				5 dias	5 dias
7 (n=8)	X			X			5 dias	5 dias
8 (n=6)	X				X		5 dias	5 dias
9 (n=5)	X					X	5 dias	5 dias



### **3.2. Procedência e caracterização do CNTF e Tat-CNTF**

As moléculas de CNTF e Tat-CNTF foram fornecidas pelo Dr. Alessandro Negro, do *Centro di Biotecnologie Innovative* (CRIBI) da Universidade de Padova (PD, Itália). A proteína CNTF foi produzida a partir da clonagem de cDNA para o CNTF humano, segundo descrito por Negro e cols. (1991). Por sua vez, a Tat-CNTF foi obtida a partir da construção de um vetor de expressão de bactéria *E. coli* capaz de expressar a proteína CNTF humana fundida à sequência Tat, formada por 15 aminoácidos. Esta sequência contém o domínio PTD que permite a translocação da proteína Tat do HIV para o interior das células. Ambas proteínas CNTF e Tat-CNTF se mostraram homogeneamente puras, quer em gel de eletroforese, quer em HPLC analítico, e possuem pesos moleculares de 24 kDa e 28 kDa, respectivamente.

### **3.3. Procedimentos cirúrgicos para a secção do nervo ciático e tratamento**

Os animais (P2) foram anestesiados por hipotermia e imediatamente posicionados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90). A pele da coxa esquerda foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo ciático foi exposto. Com auxílio de microtesoura (Vannas, Steel Inox-S. OF3212) o nervo foi dissecado até sua emergência no forame isquiático, onde foi totalmente seccionado. Após a secção do nervo ciático, foi retirado um segmento de aproximadamente três milímetros do coto distal, no sentido de assegurar a ausência de contato com o coto proximal. Nos animais dos grupos 1, 2 e 3 foi aplicado um fragmento de gelfoam embebido em 20µl de uma solução de tampão fosfato de sódio (PBS) contendo CNTF ou Tat-CNTF, nas concentrações indicadas na Tabela 1. Os animais do grupo 4 receberam igual fragmento de gelfoam contendo 20µl de

PBS (0,1M). A seguir, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de seda 8-0 (Ethicon). Os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia e serem devolvidos à mãe.

Para os animais que receberam doses subcutâneas de CNTF ou Tat-CNTF (grupos 5, 6, 7 e 8), o primeiro dia de tratamento correspondeu ao dia da lesão. Nesse dia, os animais receberam três doses de igual valor de CNTF (1,2µg/g) ou Tat-CNTF (1,2µg/g, 0,6µg/g ou 0,3µg/g) de acordo com o grupo aos quais pertenciam. A primeira aplicação foi realizada 30 minutos antes da cirurgia, a segunda imediatamente após e a terceira 2 horas depois. A partir do dia seguinte, o tratamento seguiu com uma aplicação diária, administrada no mesmo horário (13 horas), durante 5 dias. Os animais do grupo 9 receberam doses equivalentes do veículo de diluição e seguiu-se o mesmo protocolo de tratamento.

As doses para o tratamento local e subcutâneo, respectivamente, foram escolhidas com base nos resultados por nós obtidos em experimentos anteriores (Oliveira e cols. 2002) e de acordo com o relatado por outros autores em experimentos similares (Sendtner e cols., 1990; Dittrich e cols., 1994; Kwon e Gurney, 1994; Yuan et cols., 2000).

### **3.4. Avaliação do Peso Corporal**

Todos os animais foram pesados diariamente, desde a idade P2 até a idade P7 tanto nos grupos que receberam tratamento local como naqueles que receberam tratamento subcutâneo. Para a avaliação estatística da influência do tempo e do tratamento sobre o ganho de peso

corporal foi realizada análise da variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de Duncan, utilizando o programa estatístico SAS<sup>®</sup> (SAS Institute Inc.).

### **3.5. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes**

Os animais foram sacrificados após os tempos de sobrevivência mencionados nas Tabelas 1 e 2. Após anestesia com Pentobarbital sódico 3% (0,1ml/20g, i.p.) foram submetidos à toracotomia e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após a fixação, os animais foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24 h. A seguir a intumescência lombar da medula espinhal foi dissecada e processada para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes semi-seriados transversais da intumescência lombar, com 8 µm de espessura, coletados em lâminas gelatinizadas. Um conjunto de 20 cortes, representativos dos segmentos L4, L5 e L6 da intumescência lombar de cada animal, foram corados com cresil violeta. Outro conjunto de 9 cortes, representativos dos níveis medulares mencionados de cada animal, foi destinado para análise imunoistoquímica da reação astrocitária.

### **3.6. Análise quantitativa**

A análise quantitativa do efeito dos tratamentos com CNTF e Tat-CNTF foi realizada através da contagem dos motoneurônios do grupamento ventrolateral da intumescência lombar. Para isso foram empregados os cortes representativos dos segmentos L4, L5 e L6 corados com cresil violeta mencionados acima. O processamento dos cortes

seguiu o protocolo padrão para coloração de neurônios com cresil violeta 5% (Sigma). A seguir, foram desidratados em bateria de álcool-xilol e a lâminas montadas com Entelan (Merck).

Embora a distância entre os cortes seja superior a 100µm, para contagem dos motoneurônios foram considerados apenas aqueles com nucléolo evidente, evitando-se, com segurança, a dupla contagem. O lado contralateral, não lesado, foi considerado como controle no respectivo corte. O procedimento foi realizado pelo experimentador sem conhecimento prévio do grupo ao qual pertencia o espécime.

O efeito dos tratamentos foi representado pelo índice de sobrevivência neuronal que corresponde à razão entre o número de motoneurônios computados no lado lesado e o número de motoneurônios no lado não lesado (Rogério e cols., 2002). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05, utilizando-se o programa estatístico InStat® (GraphPad Software Inc.).

### **3.7. Análise imunoistoquímica**

Considerando que a reação astrocitária decorrente da lesão de nervos periféricos é um fenômeno bem estabelecido, inclusive em animais neonatos, e que a ação neuroprotetora do CNTF e Tat-CNTF podem modificar essa resposta, foi avaliada a expressão de GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) pelos astrócitos bem como sua morfologia (Adskogius e Kozlova, 1998; Rogério e cols., 2002).

Os conjuntos de cortes, representativos dos níveis medulares de cada animal, mencionados acima foram inicialmente desparafinizados em xilol e re-hidratados em bateria de álcoois e finalmente lavados em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados em solução de  $H_2O_2$  (3%) e metanol por 15 minutos. A recuperação do antígeno foi realizada empregando-se solução Tris-HCl 50mM (pH 9,5) e uréia (5%) em forno microondas (Panasonic NNS53BK Junior) por dois períodos de 3 minutos (com intervalo de 1 minuto) em potência máxima. Após, foi realizado bloqueio dos grupos aldeídos com tampão Tris-Gli 0,1M por 30 minutos e, em seguida, bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de leite em pó desnatado (5%) em tampão PBS (pH 7,4) e soro de cabra (1:6) por 3 horas. Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-GFAP (1:300; rabbit polyclonal antibody; Dako – USA, cat # Z0334), diluído em tampão de bloqueio em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (1:200) por 1 hora. A imunorreatividade foi amplificada com o kit ABC (complexo avidina-biotina) por 1 hora e revelada pela reação com  $H_2O_2$  e DAB (diaminobenzidina). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e montados com Entelan (Merck).

### **3.8. Processamento e Análise da Gordura Marrom Interescapular (GMI)**

A gordura marrom inter-escapular (GMI) foi coletada dos animais operados e tratados com doses diárias subcutâneas de CNTF (1,2 $\mu$ g/gr), Tat-CNTF (1,2 $\mu$ g/gr) ou PBS, por 5 dias. Imediatamente após a coleta a GMI foi pesada e mergulhada em uma solução de paraformaldeído 4% (PBS 0,1M; pH 7,4), onde permaneceu por 24hs a 4°C. A seguir foram

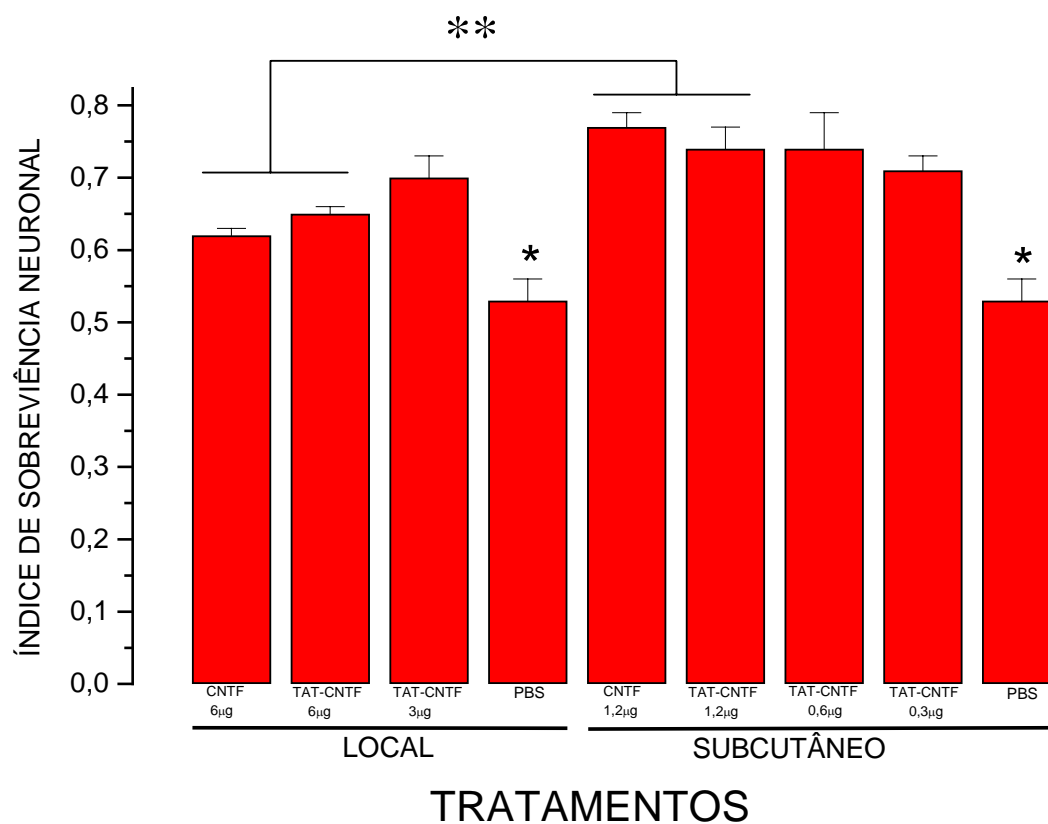
lavados em PBS, desidratados em gradiente crescente de etanol e embebidos em glicolmetacrilato (Historesina, Leica). De cada espécime foram obtidos cortes com 2 $\mu$ m de espessura, e semi-seriados, empregando-se micrótomo equipado com navalha de vidro (LKB, Bromma 8800). Os cortes foram corados com azul de toluidina, montados com Permount<sup>®</sup> (Ficher Scientific). Os mesmos foram examinados e documentados através de microscópio de luz (Leica-DMLB) equipado com vídeo câmera digital (Leica, DC 300F). Os valores do peso da GMI, bem como dos quocientes entre estes valores e os respectivos pesos corporais de cada animal (Índice de GMI;  $GMI_i = PG/PC$ ) foram analisados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05 (GraphPad InStat).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Efeito dos tratamentos sobre o Índice de Sobrevivência Neuronal (ISN)**

A análise dos valores dos ISN registrados nos grupos que receberam tratamento local ou subcutâneo com Tat-CNTF foi similar aos dos animais tratados com CNTF e superior aos registrados nos grupos controles correspondentes. Por sua vez, os grupos tratados com CNTF ou Tat-CNTF não apresentaram ISN significativamente diferentes quando comparados entre si na mesma condição de tratamento, subcutâneo ou local. Contudo, os animais tratados subcutaneamente com 1,2µg/g/dia de CNTF ou Tat-CNTF apresentaram ISN estatisticamente superior ao daqueles que receberam tratamento local com 6µg de CNTF ou Tat-CNTF. Além disso, os animais tratados com 0,6µg/g/dia e 0,3µg/g/dia de Tat-CNTF tiveram ISN significativamente maior que o observado naqueles que receberam 6µg de CNTF local (Fig. 1).

A avaliação morfológica revelou que em todos os grupos tratados com CNTF ou Tat-CNTF os motoneurônios possuíam morfologia e dimensões semelhantes aos motoneurônios contralaterais não axotomizados, com corpos celulares poligonais e núcleos centralizados. Contrariamente, nos grupos controle houve uma nítida predominância de neurônios motores com dimensões inferiores, quando comparados aos do lado contralateral (não lesado) e aos axotomizados dos animais tratados com CNTF ou Tat-CNTF (Figs. 2 e 3).



**Figura 1**

Efeito da administração local e subcutânea de CNTF e Tat-CNTF durante 5 dias após axotomia do nervo ciático de ratos neonatos (P2) sobre o ISN (média±epm). Notar que os valores dos ISN registrados nos grupos que receberam tratamento local ou subcutâneo com Tat-CNTF foram similares aos dos animais tratados com CNTF e superior aos registrados nos grupos controles correspondentes (\* $p < 0,05$ ). Contudo, os animais tratados subcutaneamente com 1,2µg/g/dia de CNTF ou Tat-CNTF apresentaram ISN superior ao daqueles que receberam tratamento local com 6µg de CNTF ou Tat-CNTF (\*\* $p < 0,05$ ). Além disso, os animais tratados com 0,6µg/g/dia e 0,3µg/g/dia de Tat-CNTF tiveram ISN significativamente maior que o observado naqueles que receberam 6µg de CNTF local.

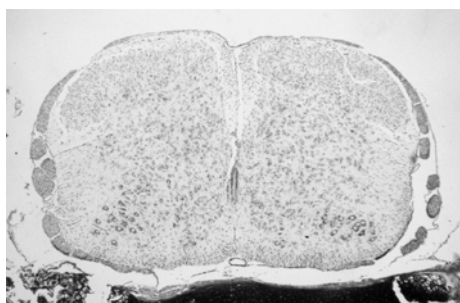


## **Figura 2**

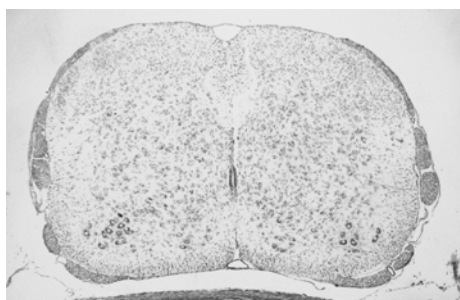
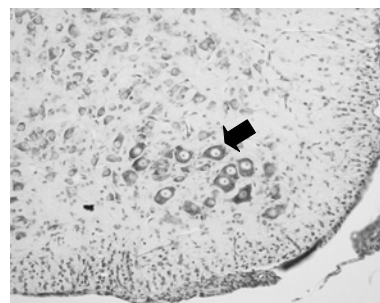
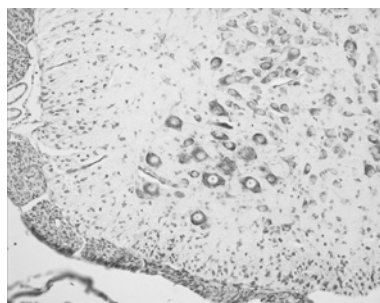
Cortes transversais da região da intumescência lombar da medula representativos dos animais que receberam doses únicas de 6µg CNTF, 6µg Tat-CNTF, 3µg Tat-CNTF ou PBS, respectivamente, administradas localmente sobre o coto proximal do nervo ciático. Note a presença do maior número de motoneurônios do grupamento ventrolateral no lado lesado de todos os animais tratados com fator neurotrófico, comparativamente aos que receberam PBS 5 dias após axotomia (P7). Note também que a dimensão dos motoneurônios nos animais tratados com CNTF ou Tat-CNTF é semelhante aos presentes no lado contralateral não lesado, ao passo que nos animais que receberam PBS tendem a ser menores. Coloração: cresil violeta. Barras: 500µm – panorâmica; 100µm – detalhes da região ventral. As setas indicam motoneurônios alfa pertencentes ao grupamento ventrolateral da intumescência lombar.

**NÃO LESADO**

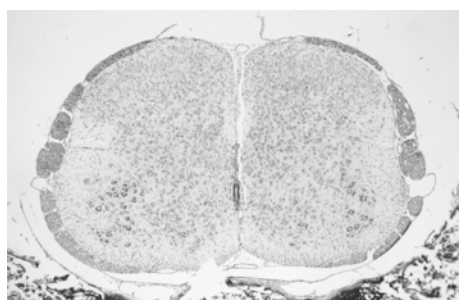
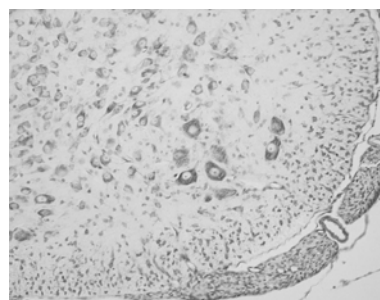
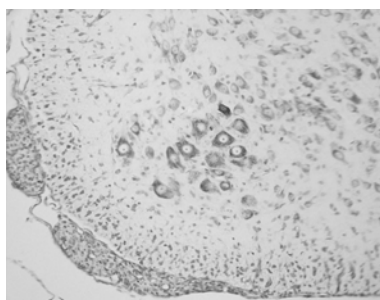
**LESADO**



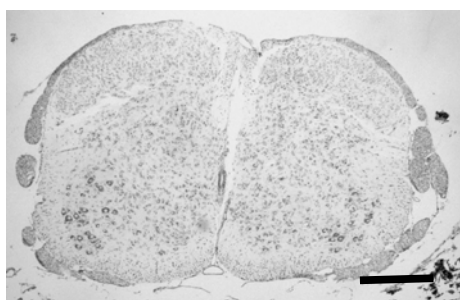
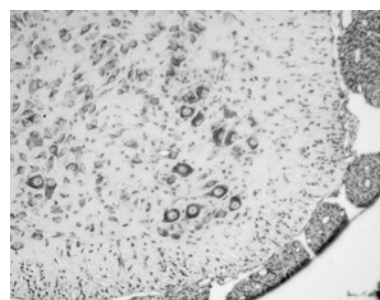
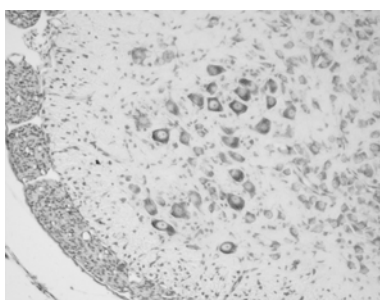
**CNTF 6µg**



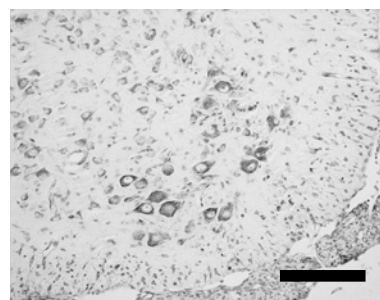
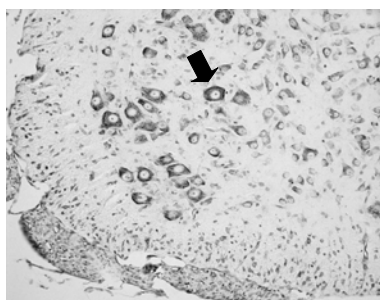
**Tat-CNTF 6µg**



**Tat-CNTF 3µg**



**PBS**

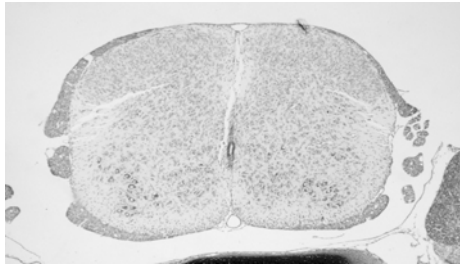


### **Figura 3**

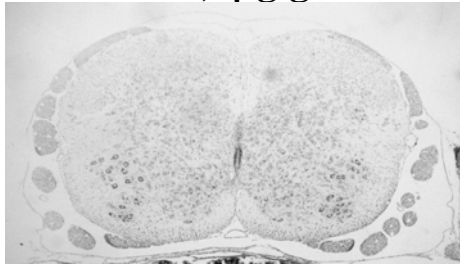
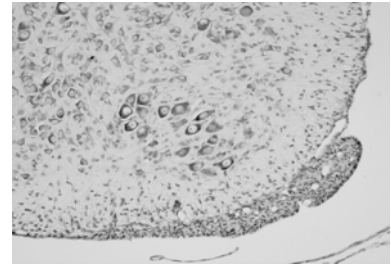
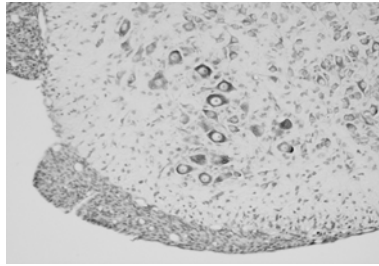
Cortes transversais da região da intumescência lombar da medula representativos dos animais que receberam tratamento com doses diárias subcutâneas com CNTF (1,2µg/g), Tat-CNTF (1,2µg/g), Tat-CNTF (0,6µg/g), Tat-CNTF (0,3µg/g) ou PBS, respectivamente, durante 5 dias (P2-P7). Note a presença do maior número de motoneurônios do grupamento ventrolateral no lado lesado de todos os animais tratados com fator neurotrófico, comparativamente aos que receberam PBS 5 dias após axotomia (P7). Note também que a dimensão dos motoneurônios nos animais tratados com CNTF ou Tat-CNTF é semelhante aos presentes no lado contralateral não lesado, ao passo que nos animais que receberam PBS tendem a ser menores. Coloração: cresil violeta. Barras: 500µm – panorâmica; 100µm – detalhes da região ventral.

**NÃO LESADO**

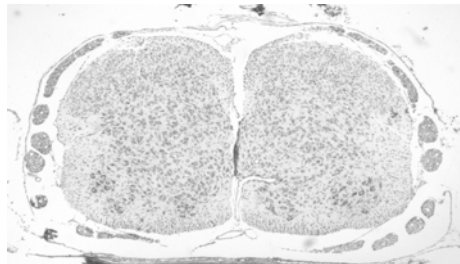
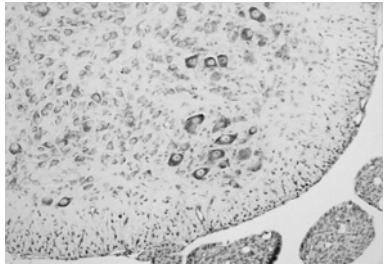
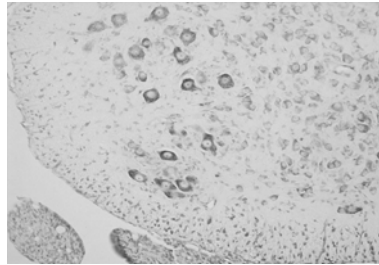
**LESADO**



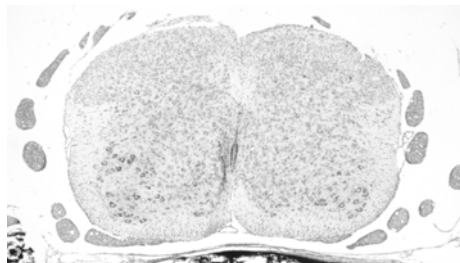
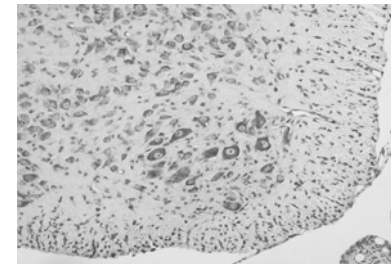
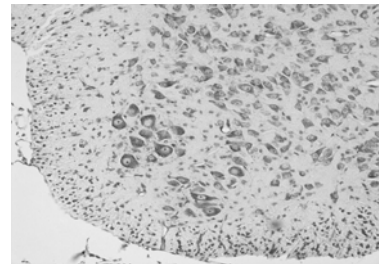
**CNTF 1,2 $\mu$ g/g/dia**



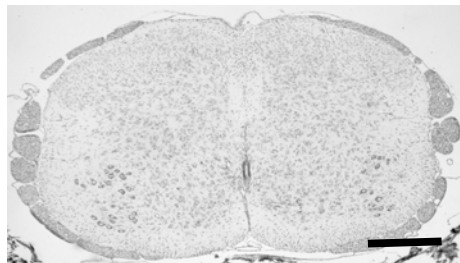
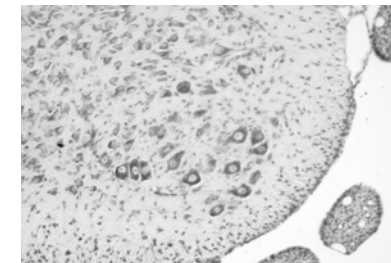
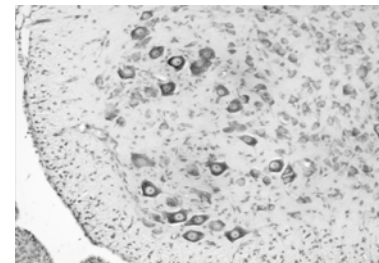
**Tat-CNTF 1,2 $\mu$ g/g/dia**



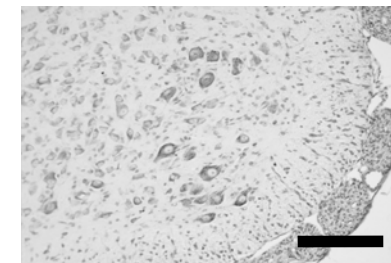
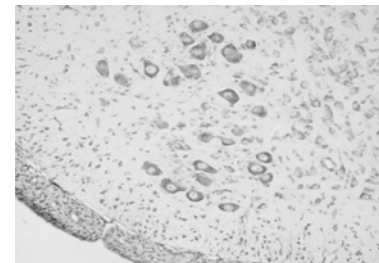
**Tat-CNTF 0,6 $\mu$ g/g/dia**



**Tat-CNTF 0,3 $\mu$ g/g/dia**



**PBS**



#### **4.2. Avaliação imunoistoquímica**

A análise da imunomarcção para GFAP revelou que os astrócitos localizados na região correspondente aos motoneurônios axotomizados (lamina IX) se mostravam hipertróficos. Estas células apresentavam forte imunoreatividade no citoplasma e prolongamentos celulares, que possuíam abundantes ramificações distribuídas pelo neurópilo ao redor dos motoneurônios. Este padrão contrastava fortemente com o observado no lado contralateral, onde a imunomarcção para GFAP foi pouco evidente nos astrócitos evidenciados pela contracoloração com hematoxilina de Harris. Por sua vez, os astrócitos localizados na região dorsal da medula espinhal ipsilateral à lesão exibiam evidente imunoreatividade para GFAP, superior à verificada no lado contralateral. Contudo, tal imunoreatividade foi menos intensa que a observada na região dos motoneurônios axotomizados (ipsilateral). Na substância branca puderam ser observados prolongamentos imuno-positivos para GFAP distribuídos de maneira radial e uniforme em todos os funículos de ambos os lados da medula. (Figs. 4 e 5)

Este padrão da imunomarcção para GFAP foi semelhante em todos os animais tratados e controle, com exceção daqueles que receberam doses subcutâneas diárias de 1,2µg/g de CNTF (Fig. 5). Interessantemente, nestes animais a imunomarcção para GFAP foi muito intensa e homogênea em toda região ventral da medula, abrangendo tanto o lado lesado quanto o lado não lesado, e estendendo-se até os funículos laterais. Embora não tenhamos realizado a avaliação morfométrica dos astrócitos GFAP positivos nestes animais, a dimensão de mesmos parecia ser semelhante em ambos lados, bem como à dos astrócitos observados nas regiões acima mencionadas nos demais grupos.

#### **Figura 4**

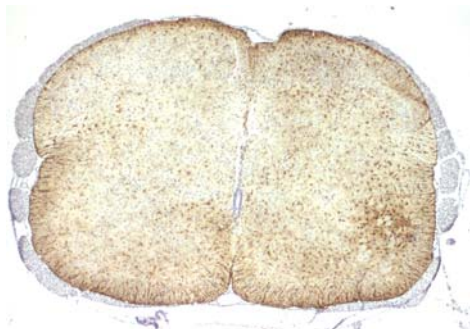
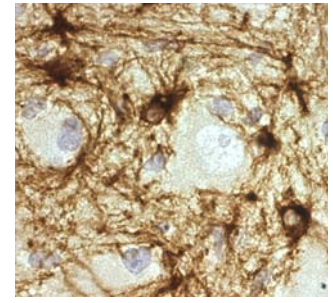
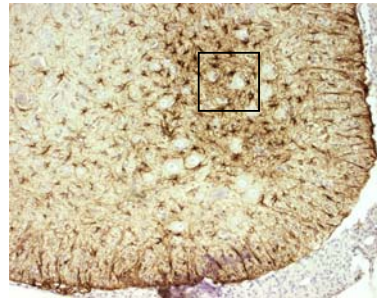
Marcação imunoistoquímica para GFAP de cortes transversais da região da intumescência lombar da medula representativos dos animais que receberam tratamento local com doses únicas de 6µg CNTF, 6µg Tat-CNTF, 3µg Tat-CNTF ou PBS, respectivamente. Observe que os astrócitos localizados na região correspondente aos motoneurônios axotomizados se mostram hipertróficos exibindo forte imunoreatividade no citoplasma e nos prolongamentos celulares, possuindo abundantes ramificações distribuídas pelo neurópilo ao redor dos motoneurônios. Note ainda, uma imunomarcação na região dorsal da medula espinhal ipsilateral à lesão. Barras: 500µm – panorâmica; 100µm – região ventral lesada; 30µm – detalhe (objetiva 100X). A seta vermelha indica a imunomarcação para GFAP presente no citoplasma de um astrócito; a seta azul indica um motoneurônio alfa; as setas pretas indicam prolongamentos de astrócitos imunomarcados distribuídos pelo neurópilo e ao redor do corpo celular de motoneurônios.



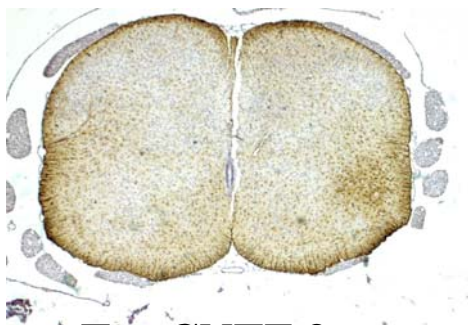
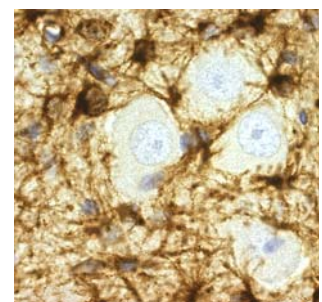
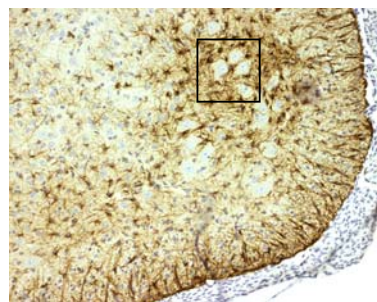
## LESADO



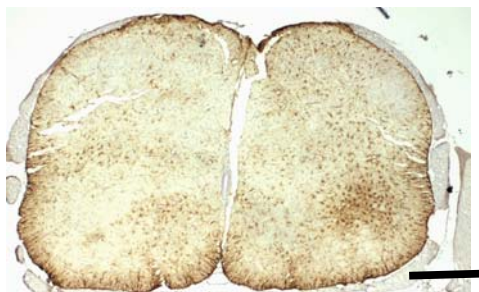
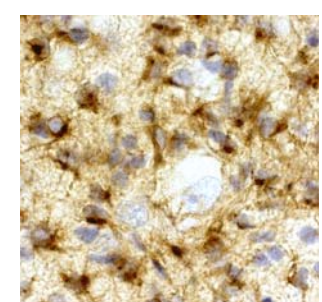
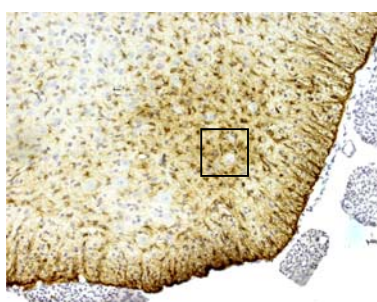
**CNTF 6µg**



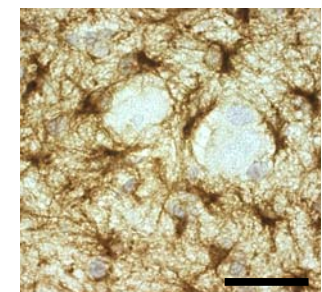
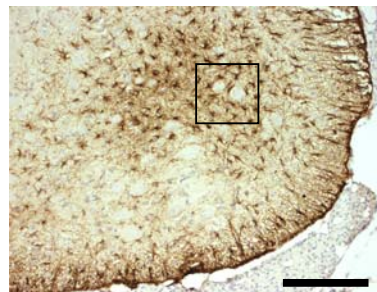
**Tat-CNTF 6µg**



**Tat-CNTF 3µg**



**PBS**

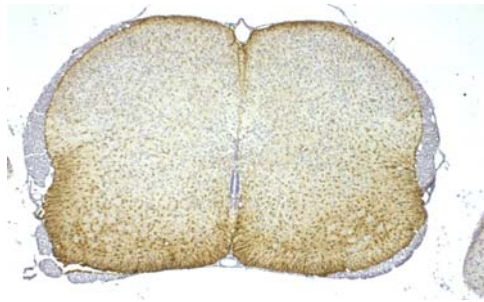


### **Figura 5**

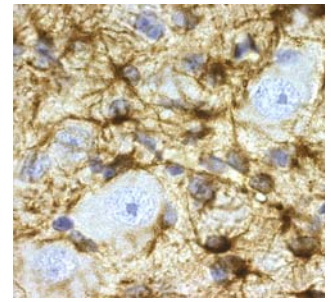
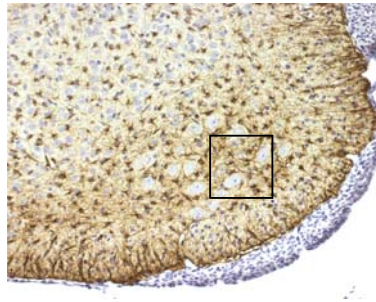
Marcação imunoistoquímica para GFAP de cortes transversais da região da intumescência lombar da medula representativos dos animais que receberam tratamento com doses diárias subcutâneas com CNTF (1,2µg/g), Tat-CNTF (1,2µg/g), Tat-CNTF (0,6µg/g), Tat-CNTF (0,3µg/g) ou PBS, respectivamente, durante 5 dias (P2-P7). Observe que os astrócitos localizados na região ventrolateral se mostram hipertróficos exibindo forte imunoreatividade no citoplasma e nos prolongamentos celulares, possuindo abundantes ramificações distribuídas pelo neurópilo ao redor dos motoneurônios. Astrócitos hipertróficos também podem ser observados na região ipsilateral dorsal à lesão. Note que o grupo tratado com CNTF exibe imunoreatividade para GFAP mais intensa na região ventral da medula que os demais grupos. Barras: 500µm – panorâmica; 100µm – região ventral lesada; 30µm – detalhe (objetiva 100X).



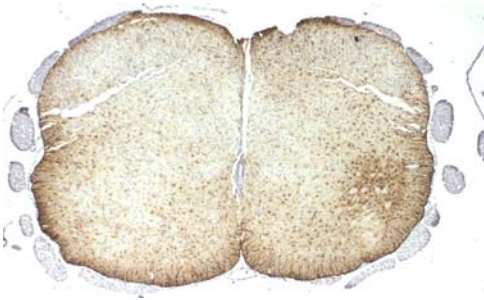
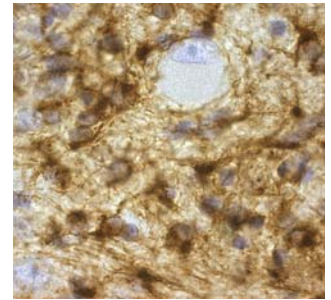
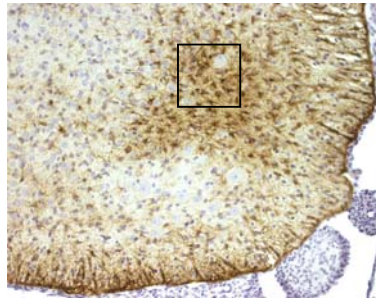
# LESADO



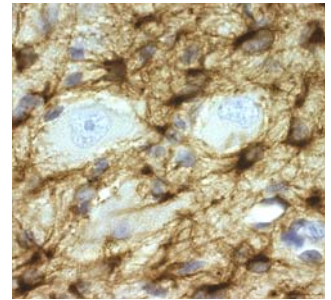
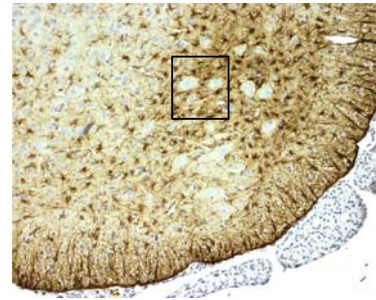
**CNTF 1,2µg/g/dia**



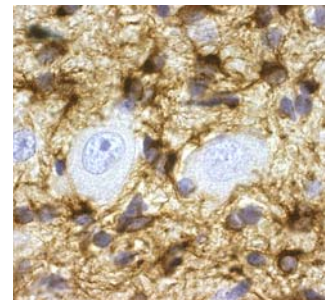
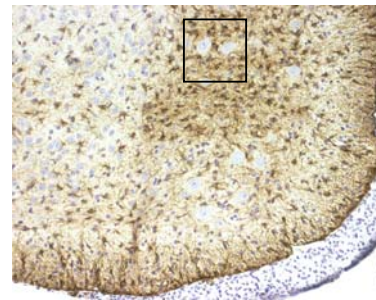
**Tat-CNTF 1,2µg/g/dia**



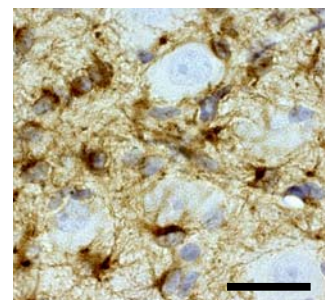
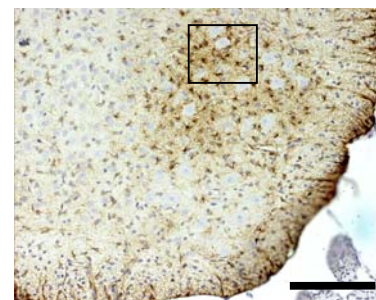
**Tat-CNTF 0,6µg/g/dia**



**Tat-CNTF 0,3µg/g/dia**



**PBS**



#### **4.3. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento ponderal dos animais**

O acompanhamento do ganho de peso dos animais entre P2 e P7 mostrou que aqueles que receberam tratamento local com CNTF ou Tat-CNTF apresentaram crescimento semelhante ao do observado nos animais do grupo controle (Fig. 6). Por outro lado, a curva de crescimento dos animais tratados com doses subcutâneas diárias de CNTF ( $1,2\mu\text{g/g}$ ), revelou que estes tiveram ganho de peso significativamente inferior aos dos animais tratados com a mesma dose ou com as doses inferiores de Tat-CNTF. O menor crescimento dos animais tratados com CNTF foi significativo a partir do segundo dia de tratamento. Na idade P7 o peso corporal desses animais foi 25% e 30% inferior ao dos animais tratados com Tat-CNTF e aos dos animais controle, respectivamente. Não houve diferença significativa de ganho de peso entre os animais tratados com as diferentes doses de Tat-CNTF e os animais tratados com PBS subcutaneamente (Fig. 6).

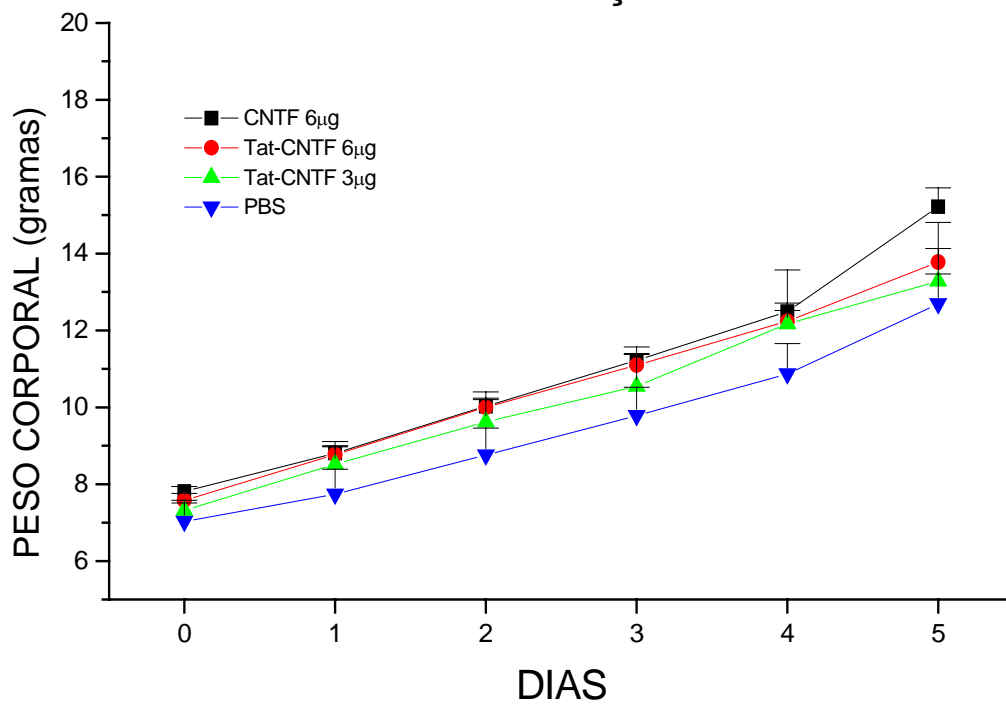
#### **4.4. Avaliação da Gordura Marrom Interescapular**

O  $\text{GMI}_i$  dos animais que receberam doses subcutâneas diárias Tat-CNTF ( $0,005\pm 0,0001$ ) foi semelhante ao registrado nos animais tratados com CNTF ( $0,004\pm 0,0002$ ) e inferior aos animais tratados com PBS ( $0,006\pm 0,0004$ ) (Fig. 7;  $p<0,001$ ). Contudo, deve-se notar que o  $\text{GMI}_i$  dos animais tratados com Tat-CNTF se aproxima do observado nos animais controle. Além disso, a análise histológica revelou que os animais tratados com Tat-CNTF exibiram GMI com morfologia semelhante aos dos animais controle, formada por adipócitos contendo abundantes gotículas lipídicas de variados tamanhos (Figs. 8C e 8D). Esta morfologia contrastou fortemente com o observado nos animais tratados com CNTF, que apresentavam células gordurosas quase totalmente depletadas de gotas lipídicas (Fig. 8B).

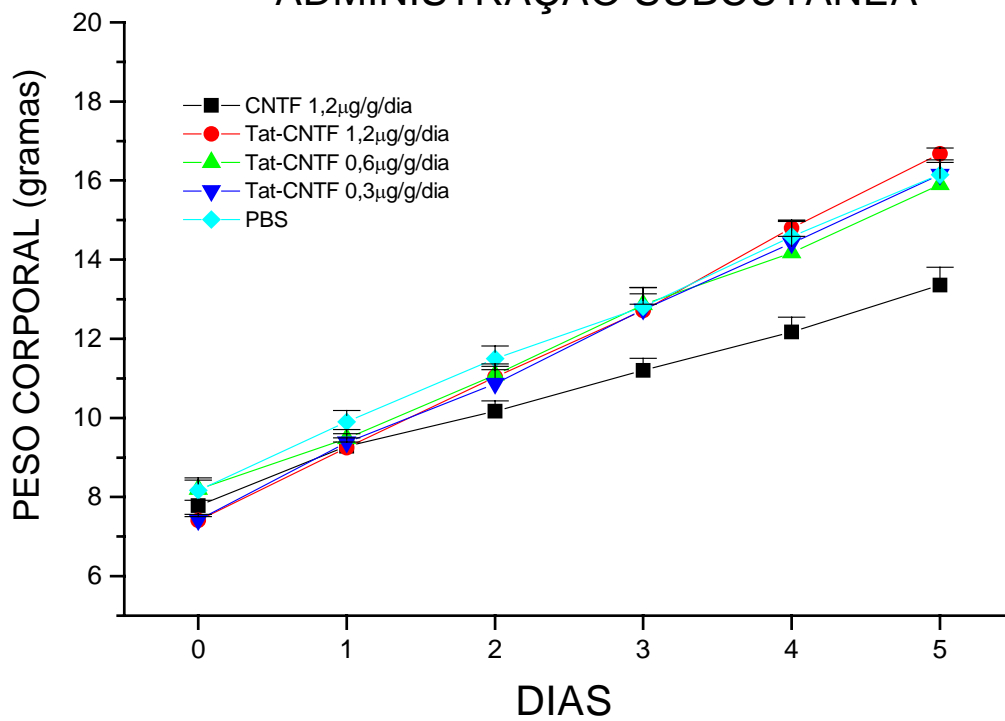
### **Figura 6**

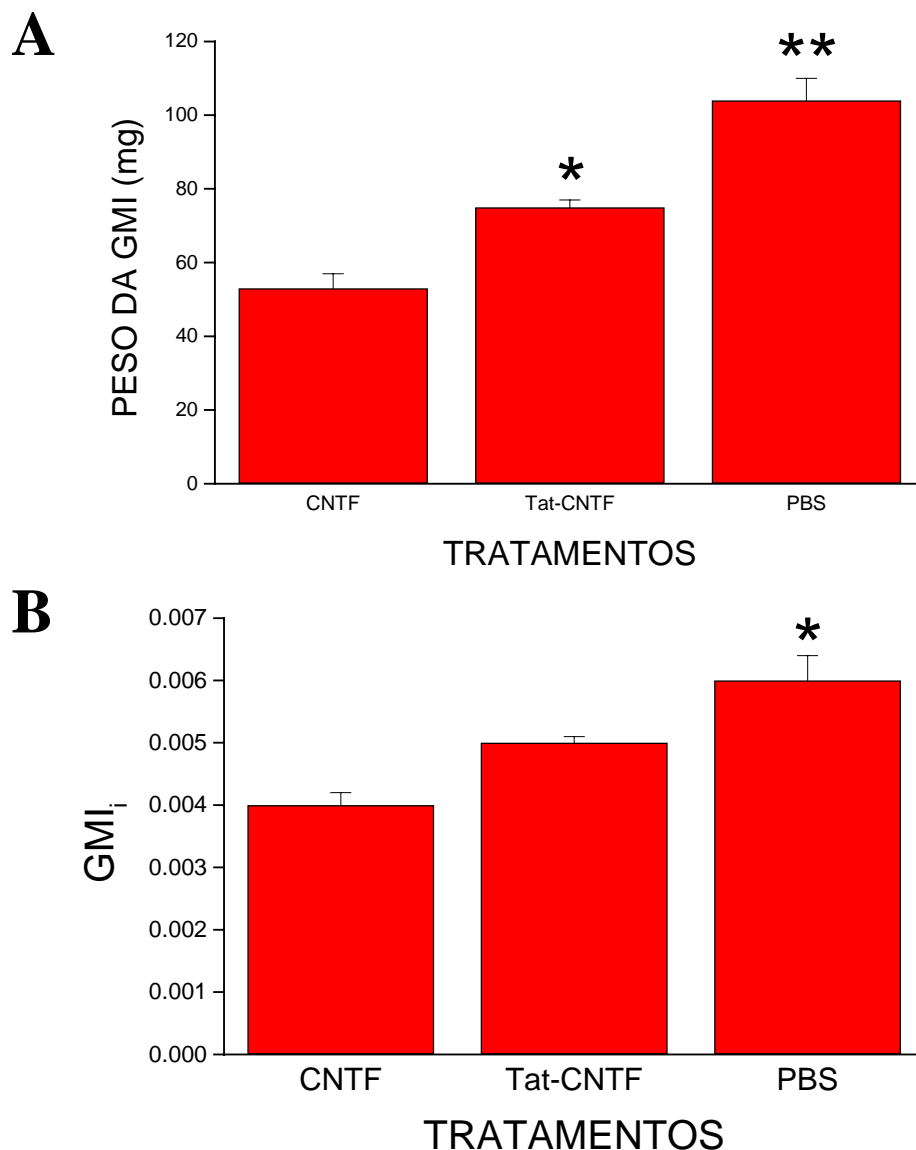
Efeito da administração local e subcutânea de CNTF e Tat-CNTF sobre o crescimento ponderal de ratos neonatos entre as idades P2 e P7, após secção do nervo ciático em P2. As curvas mostram que os animais que receberam tratamento local com CNTF ou Tat-CNTF tiveram crescimento semelhante ao do observado nos animais do grupo controle. Por outro lado, a curva de crescimento dos animais tratados com doses subcutâneas diárias de CNTF (1,2µg/g) revelou que estes tiveram ganho de peso significativamente inferior ao dos animais tratados com a mesma dose ou com as doses inferiores de Tat-CNTF. O menor crescimento dos animais tratados com CNTF foi significativo a partir do segundo dia de tratamento. Na idade P7 o peso corporal desses animais foi 25% e 30% inferior aos dos animais tratados com Tat-CNTF e aos animais controle, respectivamente. Não houve diferença significativa de ganho de peso entre os animais tratados com as doses de Tat-CNTF e os animais tratados com PBS subcutaneamente.

### ADMINISTRAÇÃO LOCAL



### ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA





**Figura 7**

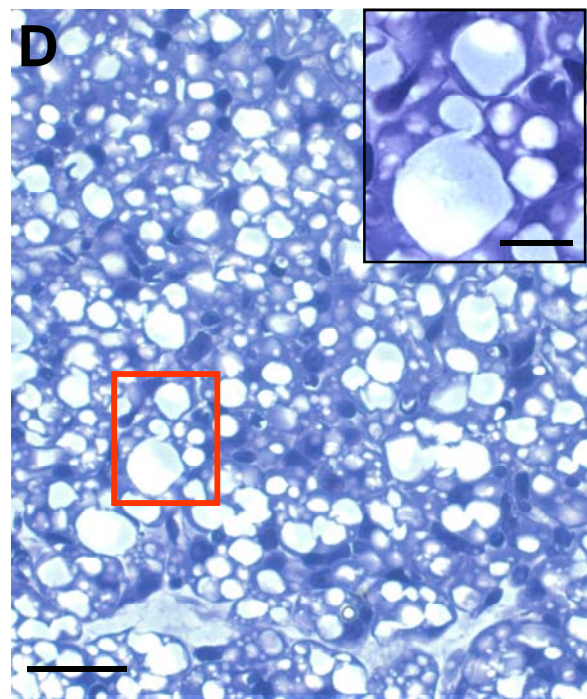
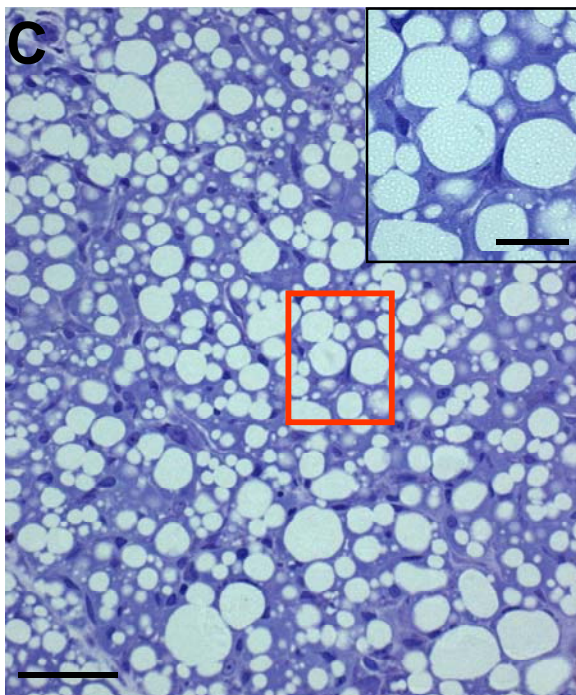
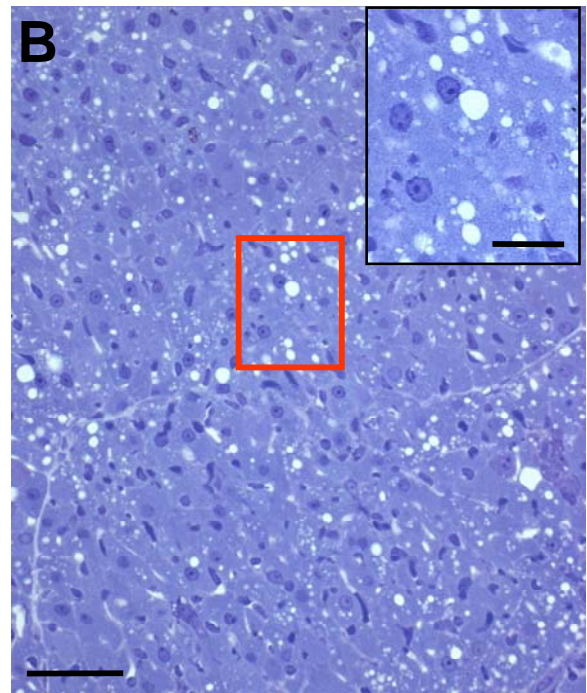
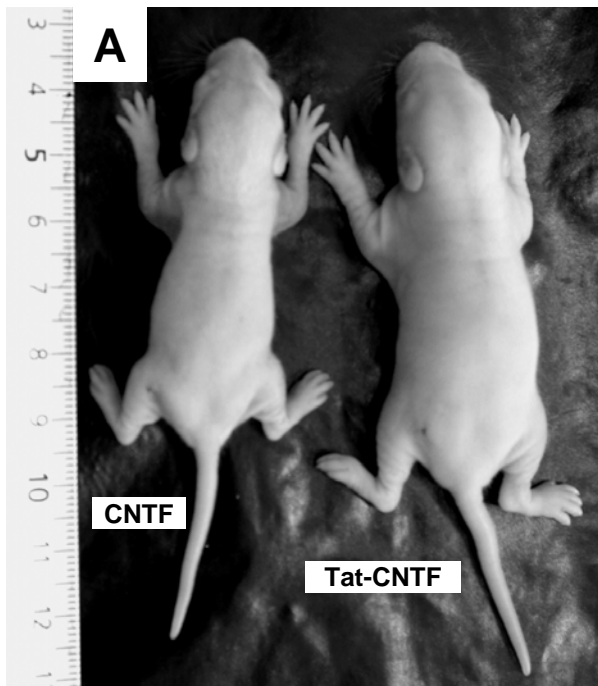
A) Gráfico do peso da Gordura Marrom Interescapular (GMI) de ratos neonatos tratados com doses diárias subcutâneas de CNTF (1,2 µg/g), Tat-CNTF (1,2 µg/g) ou PBS, entre as idades P2 e P7, depois da secção do nervo ciático em P2. Note que a média do peso da GMI nos animais tratados com Tat-CNTF (75±2mg) é superior (\*p<0,05) à dos animais tratados com CNTF (53±4mg). Observe também que em ambos grupos tratados o peso da GMI foi inferior aos dos animais controle (104±6mg; \*\*p<0,001).

B) Gráfico do índice de Gordura Marrom Interescapular (GMI<sub>i</sub>). Observe que o GMI<sub>i</sub> dos animais tratados com Tat-CNTF é semelhante ao dos animais tratados com CNTF, embora se aproxima dos observado nos animais controle (\*p<0,001).

### **Figura 8**

Ratos neonatos operados na idade P2 e tratados subcutaneamente com 1,2µg/g/dia de CNTF ou Tat-CNTF durante 5 dias (A). Cortes do tecido adiposo marrom interescapular de ratos na idade P7 tratados com doses diárias subcutâneas de 1,2µg/g de CNTF (B), 1,2µg/g de Tat-CNTF (C) ou PBS (D). Observe que os animais tratados com CNTF (B) exibem adipócitos com poucas e pequenas gotas lipídicas, ao passo que a gordura marrom dos animais tratados com Tat-CNTF ou PBS (C e D) possui abundantes gotas lipídicas de tamanhos variados. (B, C e D, barras=50µm; detalhe, barras=20µm).





## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo representa a primeira investigação sobre o efeito da administração local e sistêmica do CNTF acoplado a uma sequência de 15 aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV (Tat-CNTF) na sobrevivência de motoneurônios espinhais após axotomia.

O modelo experimental da axotomia em ratos neonatos empregado neste trabalho tem sido escolhido por vários autores para o estudo de agentes neurotróficos e/ou neuroprotetores (Sendtner e cols., 1990, 1992; Yan e cols, 1992, Vergani e cols.,1998; Rogério e cols., 2002, 2005). É sabido que a axotomia produzida pelo esmagamento ou secção de nervos periféricos em roedores no período da primeira semana de vida é capaz de acarretar a morte de um grande número dos motoneurônios lesados. Esse efeito é tanto mais drástico quanto mais jovem for o animal, podendo acarretar a morte de praticamente 100% dos motoneurônios quando a axotomia é realizada na idade P0 (Lowrie e Vrbova, 1992; Snider e cols., 1992; Vejsada e cols 1995). Além disso, durante a primeira semana de vida as células de Schwann parecem não expressar CNTF, já que sua detecção através de imunoistoquímica, bem como do seu mRNA através de Northern blot, só foi possível após esse período em ratos (Stöckli e cols. 1991; Dobrea e cols, 1992; Sendtner e cols., 1997).

Nossos resultados mostraram que a administração de Tat-CNTF, local ou subcutânea, reduziu de maneira significativa a morte dos motoneurônios do grupamento ventrolateral da intumescência lombar de ratos, 5 dias após secção do nervo ciático. Além disso, esse efeito neuroprotetor foi observado mesmo quando a dose de Tat-CNTF foi 75% inferior àquela de CNTF administrada subcutâneamente. Tais achados mostraram de



maneira consistente que a adição da sequência de 15 aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV ao CNTF não modificou seu potencial neurotrófico.

Por outro lado, vale destacar que o tratamento com doses diárias subcutâneas de CNTF ou Tat-CNTF produziu ISN superior aos observados com a sua administração local. Este dado pode ser explicado pelo fato da administração subcutânea diária ter determinado uma maior disponibilidade de CNTF ou Tat-CNTF para os motoneurônios axotomizados, comparativamente ao tratamento local. Estas moléculas, quando aplicadas direta e uma única vez sobre o coto proximal do nervo, devem ter sido degradadas após um curto período de tempo (Dittrich e cols., 1994). Mesmo se considerarmos que tenham entrado na circulação sistêmica, certamente elas não alcançaram e nem se mantiveram em concentrações plasmáticas semelhantes às produzidas pela administração diária. Desta forma, o efeito neurotrófico do CNTF e da Tat-CNTF administrados localmente deveu-se sobretudo à sua captação pelas extremidades dos axônios lesados e de seu transporte retrógrado (Curtis e cols., 1993; Curtis e DiStefano, 1994).

A constatação do efeito neurotrófico da Tat-CNTF sugere fortemente que esta manteve sua afinidade pelos receptores do CNTF presentes nos motoneurônios. Estes receptores são complexos protéicos compostos por três subunidades: CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  e gp130. Além disso, a própria presença do PTD da Tat do HIV na sequência de aminoácidos acoplada à molécula de CNTF pode ter contribuído para que esse efeito tenha sido produzido mesmo quando administrada subcutaneamente em doses 50% e 75% inferiores a de CNTF. Ou seja, tal sequência ao realizar a translocação da proteína para o interior da célula, por inserção na matriz lipídica da membrana, aumentaria a probabilidade

da região ligante da Tat-CNTF interagir com os receptores do CNTF na superfície extracelular na membrana.

É plausível supor ainda que este mesmo mecanismo poderia facilitar a interação da região ligante da Tat-CNTF com receptores do LIF (LIFR $\beta$  e gp130), o qual exerce importante efeito neurotrófico e cuja expressão aumenta significativamente nos motoneurônios após axotomia (Li e cols., 1995; Haas e cols., 1999). De fato, tem sido proposto que o CNTF poderia também se ligar ao receptor dimérico do LIF especialmente quando administrado em altas concentrações (Monville e cols., 2001). Além disso, verificou-se que o CNTF pode exercer efeitos biológicos mesmo sobre células que não expressam seu receptor específico (CNTFR $\alpha$ ), mas apenas receptor para o LIF (Schooltink e cols., 1992; Davis e cols., 1993b; Gearing e cols., 1993).

Não podemos descartar também a possibilidade do CNTF e da Tat-CNTF se terem ligado ao CNTFR $\alpha$  solúvel após alcançar a circulação sistêmica. Para a Tat-CNTF isto pode ter representado um fator facilitador adicional da sua ação neurotrófica comparativamente ao CNTF (Davis e cols., 1993a; Sleeman e cols., 2000).

Outro importante dado, já mencionado acima, foi o fato da ação neuroprotetora da Tat-CNTF ter se manifestado mesmo na dose subcutânea diária de 0,3 $\mu$ g/gr. Considerando-se que certa quantidade de Tat-CNTF pode ter sido internalizada pelas células do animal, reduzindo assim sua disponibilidade para os motoneurônios, este dado revela o alto potencial neuroprotetor dessa molécula. Este fato se reveste ainda de maior importância se considerarmos que o tratamento com Tat-CNTF não produziu, ou minimizou, os efeitos colaterais observados nos animais tratados com CNTF, conforme discutiremos abaixo.

A morte dos motoneurônios induzida pela axotomia é também dependente da resposta das células gliais. Sabe-se que após secção de um nervo periférico ocorre ativação dos astrócitos, sendo que a magnitude da reação varia com a idade e espécie animal (Aldskogius e Kozlova, 1998). Esta reação astrocitária na medula espinhal é um fenômeno bem estabelecido em ratos recém nascidos, caracterizada pelo aumento da síntese de proteína ácida fibrilar (GFAP) e pela hipertrofia dos astrócitos (Aldskogius e Kozlova, 1998; Rogério e cols., 2002). Embora os mecanismos da resposta dos astrócitos não sejam bem conhecidos, considera-se que elas sejam as primeiras células gliais a sinalizarem a perturbação da homeostase provocada pela lesão (Aldskogius e Kozlova, 1998).

É sabido também que, além de células de Schwann associadas a fibras mielínicas, subpopulações de astrócitos também produzem CNTF (Stöckli e cols., 1991; Friedman e cols., 1992; Rende e cols., 1992; Dallner e cols., 2002). Após lesões no sistema nervoso central ou periférico ocorrem dramáticas alterações na expressão de CNTF e do seu receptor nos astrócitos das regiões afetadas (Rudge e cols., 1992; Ip e cols., 1993; Henderson e cols., 1994b; Kirsch e Hofmann, 1994; Richardson, 1994; Asada e cols., 1995; Duberley e cols., 1995). Desta forma, consideramos importante investigar os efeitos que o tratamento com CNTF e Tat-CNTF tiveram sobre as características morfológicas dos astrócitos e a sua imunorreatividade para a GFAP.

Vários trabalhos apresentaram evidências de que o CNTF atue como um potente regulador da resposta dos astrócitos à lesão. Quando injetado diretamente no neocórtex de ratos neonatos e adultos, o CNTF promove aumento da reatividade astrocitária (Winter e cols., 1995; Kahn e cols., 1995, 1997; Ridet e cols., 1997; Aldskogius e Kozlova, 1998;

Martin e cols, 2003; Ye e cols, 2004). Por sua vez, Albrecht e cols. (2002, 2003) verificaram esse mesmo efeito quando o CNTF foi injetado na medula espinhal de ratos adultos. Estes mesmos autores mostraram que o CNTF exerce uma potente ação direta nos astrócitos *in vitro*, provocando hipertrofia do citoplasma, aumento do volume nuclear e da expressão de GFAP. Além disso, verificaram que o CNTF estimulou a expressão e liberação de FGF-2 pelos astrócitos em cultura. Estes autores propuseram que este efeito do CNTF sobre a fisiologia dos astrócitos revele o lado neuroprotetor da resposta glial, importante para o restabelecimento funcional dos neurônios após lesões.

Nossos resultados sobre a imunomarcação para GFAP evidenciaram que a secção do nervo ciático promoveu no lado ipsilateral à lesão uma astrogliose intensa na região ventrolateral e moderada na região dorsal. As características morfológicas dos astrócitos reativos foram semelhantes em todos os grupos, independentemente do tratamento, e concordes com as relatadas por outros autores (Aldskogious e Kozlova, 1998; Rogério e cols., 2002). Contudo, nos animais tratados subcutaneamente com CNTF a imunoreatividade para GFAP foi mais intensa na região ventral da medula que os demais grupos. Além disso, esta se distribuiu em ambos lados, revelando a presença de astrócitos hipertróficos ipsi e contralaterais à lesão. Interessantemente, em condições normais os astrócitos expressam CNTF, porém não expressam o CNTFR $\alpha$ , bem como seu mRNA. Ao entrarem em estado reativo aumentam a expressão do CNTF e passam a expressar o CNTFR $\alpha$  (Ip e cols., 1993; Rudge e cols., 1994; Duberley e cols., 1995). É razoável supor que a lesão do nervo ciático em nosso modelo induziu a expressão CNTFR $\alpha$  predispondo-os à ação do CNTF, principalmente quando administrado por via subcutânea. Além disso,

tem sido proposto que o CNTF pode atuar sobre os astrócitos através de sua ligação com receptores do LIF (Monville e cols, 2001). Desta forma, o CNTF administrado subcutaneamente pode ter ativado seu receptor específico e também o receptor para o LIF, desencadeando assim a intensa resposta astrocitária observada.

Por outro lado, é particularmente intrigante o fato dos grupos que receberam tratamento diário subcutâneo com Tat-CNTF não terem exibido resposta astrogial tão intensa quanto à apresentada pelos animais tratados com CNTF. Este dado indica que um maior número de astrócitos foi ativado pelo CNTF ao ser administrado subcutaneamente e na mesma concentração da Tat-CNTF (1,2µg/g). Recentemente, Ye e cols. (2004) mostraram que a reação astrocitária é dependente da concentração de CNTF quando administrado exogenamente após lesão medular em ratos adultos. Conforme já referimos acima, a internalização da Tat-CNTF pelas células do animal deve reduzir sua disponibilidade no meio extracelular. Assim, é plausível supor que seu efeito sobre a resposta astrocitária tenha sido limitado por esse fato, quando comparado ao induzido pelo CNTF administrado na mesma concentração.

Contudo, não podemos descartar a possibilidade do efeito neuroprotetor da Tat-CNTF, assim como do CNTF, ter-se realizado indiretamente através da sua ação sobre a resposta astrocitária. Neste sentido, Ozog e cols. (2002a, 2004) mostraram que o CNTF associado ao CNTFR $\alpha$  solúvel ativa a via JAK/Stat nos astrócitos em cultura e aumenta a expressão da conexina 43 (Cx43). As conexinas são proteínas constituintes das junções comunicantes (gap junctions) que permitem aos astrócitos se manterem altamente acoplados (Kumar and Gilula, 1996). Vários estudos, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*,

demonstraram que esse acoplamento tem importante papel na manutenção da homeostase no tecido nervoso. Defeitos na construção das junções comunicantes e/ou na expressão da Cx43 pelos astrócitos aumenta a vulnerabilidade dos neurônios a lesões diversas (Blanc e cols., 1998; Siushansian e cols., 2001; Naus e cols., 2001; Ozog et al., 2002b; Nakase e cols., 2003; Lin e cols., 2003).

Embora não tenhamos realizado avaliações sobre a expressão da Cx43 em nosso modelo, é provável que tanto CNTF como Tat-CNTF, administrados subcutaneamente, tenham estimulado o aumento da expressão desta nos astrócitos. Tal efeito pode ter sido induzido através da sua interação com o CNTFR $\alpha$  que passou a ser expresso pelos astrócitos ativados, ou com CNTFR $\alpha$  solúvel (Rudge e cols., 1994; Ozog e cols., 2004). A favor desta hipótese, verificamos recentemente que o tratamento de animais neonatos durante 5 dias (P2 a P7) com Tat-CNTF ou CNTF aumentou significativamente a expressão do gene da Cx43 no cérebro desses animais (dados não publicados). Deste modo, a ação neuroprotetora do CNTF e da Tat-CNTF pode também ser atribuída à sua capacidade de ampliar o acoplamento entre os astrócitos e de manter a homeostasia no microambiente medular (Aldskogious e Kozlova, 1998). Esse último efeito pode ter sido ainda mais abrangente no que se refere ao CNTF, considerando a maior extensão da imunoreatividade para GFAP observada nos animais tratados com o mesmo. Contudo, análises mais detalhadas sobre a ativação astrocitária em nosso modelo experimental são necessárias.

No conjunto dos nossos resultados é particularmente relevante o fato da neuroproteção proporcionada pela administração subcutânea de 1,2 $\mu$ g/g/dia de Tat-CNTF

não ter sido acompanhada pela redução do ganho de peso e pela intensa mobilização de lipídeos da GMI observadas nos animais tratados com igual dose de CNTF. Este dado sugere fortemente que a conjugação da sequência Tat ao CNTF foi responsável pela eliminação ou redução significativa de efeitos colaterais importantes do CNTF (Henderson e cols., 1994a; Kwon e Gurney, 1994; Zhang e cols., 1995; Ulenkate e cols. 1996; Miller e cols., 1996a,b).

Recentemente vários autores obtiveram evidências de os efeitos do CNTF sobre o metabolismo decorrem de sua capacidade de ativar processos de sinalização intracelular que envolve a via JAK/Stat, análogos àquelas usadas pela leptina (Haas e cols. 1999; Dolcet e cols., 2001; Lambert e cols., 2001; Ott e cols., 2002; Jiao e cols., 2003; Zvonic e cols., 2003). Dentro desse cenário tem recebido particular atenção o estudo da ação do CNTF sobre a fisiologia dos adipócitos. Verificou-se que essas células possuem o complexo-receptor específico para CNTF e que sua ativação pode modificar a expressão gênica nas mesmas (Gloaguen e cols., 1997; Lambert e cols., 2001; Ott e cols., 2002; Zvonic e cols., 2003).

Conforme já mencionado, nossos resultados evidenciaram que os animais tratados subcutaneamente com 1,2µg/g/dia de CNTF apresentaram significativa redução no ganho de peso quando comparados àqueles tratados com igual dose de Tat-CNTF ou PBS. Por sua vez, os animais destes dois últimos grupos apresentaram curvas de crescimento semelhantes. Além disso, é interessante notar que o peso da gordura marrom inter-escapular (GMI) foi superior nos animais tratados com Tat-CNTF quando comparado aos dos animais que receberam CNTF. Embora, o quociente entre o peso da GMI e o peso

corporal ( $GMI_i$ ) tenha sido semelhante entre os animais tratados com CNTF ou Tat-CNTF, a análise histológica da GMI revelou que os animais tratados com CNTF apresentaram adipócitos com poucas e pequenas gotas de gordura, ao passo que nos animais tratados com Tat-CNTF estas células exibiam abundantes gotas lipídicas de tamanhos variados, semelhantes às observadas nos animais tratados com PBS.

Interessantemente, não obstante o aspecto histológico da GMI ser o mesmo nos animais tratados com Tat-CNTF e nos animais controle (PBS), e do fato de não ter havido diferença entre as curvas de crescimento desse grupos, o peso e o  $GMI_i$  foi maior nos animais controle (PBS) quando comparado o dos grupos tratados com CNTF ou Tat-CNTF. Embora não tenhamos realizado a morfometria da GMI e/ou quantificado os lipídeos armazenados pela mesma, estes resultados sugerem que a Tat-CNTF pode ter atuado sobre os seus adipócitos promovendo a mobilização de lipídios. Contudo, é importante notar que tal mobilização foi expressivamente inferior à promovida pelo CNTF.

É necessário considerar também que o CNTF pode induzir perda de peso através de uma ação central, reduzindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo envolvidos no controle alimentar (Xu e cols., 1998). Evidências dessa possibilidade foram recentemente obtidas por Duff e cols. (2004). Estes autores mostraram que a injeção intra-cérebro-ventricular de CNTF em ratos adultos foi capaz de induzir a morte de adipócitos no tecido gorduroso do epidídimo e das regiões inguinais, retro-peritoniais e inter-escapular. Esse efeito foi significativamente mais potente que o produzido pela administração de leptina pela mesma via. Nesta mesma linha de investigação, Jho e cols. (2004) mostraram que a administração intra-cérebro-ventricular de



CNTF em ratos adultos, durante 5 dias, produziu perda de peso corporal, diminuição da ingesta calórica e aumento da concentração de mioglobina sérica. Interessantemente, os autores verificaram que esses animais apresentaram aumento da atividade do proteassomo 20S hepático, bem como do seu mRNA. Jho e cols. (2004) propuseram então que os efeitos de CNTF seriam decorrentes de uma combinação da inibição do apetite ao nível central e da supra-regulação (upregulation) da via ubiquitina-proteassomo.

Nossos dados sobre os efeitos colaterais a neuroproteção produzidos pelo CNTF em ratos neonatos são concordes com as observações realizadas em ratos adultos e adultos jovens (Henderson e cols., 1994a; Kwone e Gurney, 1994; Zhang e cols., 1995; Ulenkate e cols. 1996). Particularmente, dentre esses estudos destacamos o realizado por Ulenkate e cols. (1996) com ratos adultos jovens ainda em crescimento. A administração de CNTF subcutâneamente nestes animais produziu redução de ganho de peso semelhante ao observado nos animais recém nascidos em nossos experimentos.

No momento podemos apenas supor que em nosso modelo experimental os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos colaterais do CNTF sejam os mesmos propostos na literatura para animais adultos. Certamente, investigações futuras deverão ser realizadas a fim de confirmar tal hipótese. Além do mais, o fato da Tat-CNTF não ter produzido, ou reduzido, os efeitos colaterais do CNTF tornam ainda mais importantes futuras investigações para testar essa hipótese.

Paralelamente, considerando as propriedades da Tat-CNTF nossos dados permitem supor que a rápida internalização da mesma pelas células do animal tenha levado sua concentração extracelular para valores nos quais sua ação sobre os adipócitos é minimizada. Isto parece ser um aspecto muito importante do ponto de vista farmacológico

já que a Tat-CNTF, mesmo na dose de 0,3µg/g/dia, exerceu importante efeito neuroprotetor sobre os motoneurônios axotomizados.

Outra faceta interessante das propriedades do CNTF e da Tat-CNTF, relacionadas com os efeitos observados em nosso modelo experimental, foi verificada em recentes experimentos *in vitro* realizados no Laboratório de Metabolismo e Pâncreas Endócrino do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp. Estes experimentos mostraram que a presença de CNTF (20 ng/ml) em culturas de ilhotas pancreáticas de ratos neonatos (P2) causou diminuição da secreção de insulina em resposta à glicose. Interessantemente, a presença Tat-CNTF também causou redução da secreção de insulina em resposta a glicose, porém menor que a produzida pelo CNTF (dados não publicados).

Também foi verificado que altas concentrações de CNTF (50 e 250ng/ml) inibem a secreção da insulina em culturas de ilhotas pancreáticas de ratos adultos induzida pela estimulação aguda com glicose (Wadt e cols., 1998). Por sua vez, estudos *in vivo* também constatarem que o CNTF causou atenuação da hiperinsulinemia em camundongos C57BL/6J (ob/ob), que não possuem o gene da leptina (Gloaguen e cols., 1997; Lambert e cols., 2001).

Desta forma, a inibição da secreção de insulina pelo CNTF verificada em culturas de ilhotas pancreáticas e *in vivo* pode explicar, pelo menos em parte, nossas observações sobre o crescimento ponderal e a mobilização de lipídios da gordura marrom em ratos neonatos. De fato, a exposição de neonatos à insulina exógena durante o período posnatal, leva à obesidade, uma vez que ela promove, quando em excesso, a síntese e armazenamento de lipídios (Dorner e Plagemann, 1994; Wilson e cols., 1998; Blüher e

cols., 2002). Por outro lado, a falta da mesma leva à lipólise das reservas de gordura, liberando na circulação sanguínea grande quantidade de ácidos graxos e glicerol (Wilson e cols., 1998; Holm, 2003). Desta forma, os dados observados em culturas de ilhotas pancreáticas parecem indicar que a mobilização da gordura marrom nos animais tratados com 1,2µg/g de CNTF foi também devido à diminuição da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Paralelamente, sabe-se que a insulina promove a formação de proteínas e impede a sua degradação (Wilson e cols., 1998). Assim, a inibição da secreção de insulina pelo CNTF pode ter contribuído para a redução do ganho de peso corporal. Neste contexto, nossas observações sobre os efeitos da Tat-CNTF em nosso modelo experimental incitam futuras investigações para o melhor conhecimento dos seus mecanismos de ação, considerando especialmente a distribuição sistêmica e internalização da mesma pelas células *in vivo*. De fato, nossas presentes observações não permitem privilegiar qualquer dos modelos propostos para os mecanismos de internalização de proteínas associadas com o PTD da Tat do HIV (Dietz e Bähr, 2004).

Finalizando, nossos resultados mostram pela primeira vez que a Tat-CNTF têm efeito neuroprotetor sobre motoneurônios axotomizados em ratos neonatos e não produz os efeitos colaterais do CNTF. Além disso, levantam novas e importantes questões cujas respostas deverão contribuir para julgar adequadamente o possível emprego dessa estratégia terapêutica no tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas em seres humanos.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que:

- A adição da seqüência de 15 aminoácidos contendo o PTD da Tat do HIV ao CNTF (Tat-CNTF) não modificou a ação neuroprotetora deste fator neurotrófico sobre motoneurônios axotomizados de ratos neonatos (P2).
- A ação neuroprotetora da Tat-CNTF ocorreu mesmo em doses 50% (local e s.c.) e 75% (s.c.) inferiores às administradas de CNTF.
- O efeito neuroprotetor da Tat-CNTF não foi acompanhado pela redução do crescimento corporal entre as idades P2 e P7 observada nos animais que receberam tratamento subcutâneo com CNTF.
- Os animais tratados com Tat-CNTF não apresentaram a intensa mobilização de GMI observada no grupo tratado com CNTF subcutaneamente.
- A resposta astrogliar nos animais tratados com Tat-CNTF foi menos intensa que a observada nos animais que receberam tratamento subcutâneo com CNTF.

Assim sendo:

- Os resultados obtidos suportam a hipótese que a adição do domínio PTD a moléculas neurotróficas representa uma estratégia promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas.
- Em particular, nossos resultados revelaram que a Tat-CNTF além de possuir ação neuroprotetora não produziu os importantes efeitos colaterais do CNTF, mesmo quando administrado em igual dose deste último. Este dado é especialmente relevante e abre perspectivas para seu possível emprego em moléstias neurodegenerativas que afetam os motoneurônios espinhais, como a esclerose lateral amiotrófica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBISCHER P, SCHLUEP M, DEGLON N, JOSEPH JM, HIRT L, HEYD B, GODDARD M, HAMMANG JP, ZURN AD, KATO AC, REGLI F, BAETGE EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Nat Med.**, **2(6)**:696-9, 1996.
- ALBRECHT PJ, DAHL JP, STOLTZFUS OK, LEVENSON R, LEVISON SW. Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. **Exp Neurol.**, **173(1)**:46-62, 2002.
- ALBRECHT PJ, MURTIE JC, NESS JK, REDWINE JM, ENTERLINE JR, ARMSTRONG RC, LEVISON SW. Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. **Neurobiol Dis.**, **13(2)**:89-101, 2003.
- ALDSKOGLIUS H, KOZLOVA EN. Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. **Prog Neurobiol.**, **55(1)**:1-26, 1998.
- ASADA H, IP NY, PAN L, RAZACK N, PARFITT MM, PLUNKETT RJ. Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. **J Neurosci Res.**, **40(1)**:22-30, 1995.
- BACHOU-LEVI AC, DEGLON N, NGUYEN JP, BLOCH J, BOURDET C, WINKEL L, REMY P, GODDARD M, LEFAUCHEUR JP, BRUGIERES P, BAUDIC S, CESARO P, PESCHANSKI M, AEBISCHER P. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. **Hum Gene Ther.**, **11(12)**:1723-9, 2000.
- BARBACID M. The Trk family of neurotrophin receptors. **J Neurobiol.**, **25(11)**:1386-403, 1994.
- BARBIN G, MANTHORPE M, VARON S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. **J Neurochem.**, **43(5)**:1468-78, 1984.
- BECK M, KARCH C, WIESE S, SENDTNER M. Motoneuron cell death and neurotrophic factors: basic models for development of new therapeutic strategies in ALS. **Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.**, **2(Suppl.1)**:S55-68, 2001.
- BECKER-HAPAK M, MCALLISTER SS, DOWDY SF. Tat-mediated protein transduction into mammalian cells. **Methods**, **24(3)**:247-56, 2001.
- BENNET MR, GIBSON WG, LEMON G. Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on. **Auton Neurosci.**, **95(1-2)**:1-23, 2002.
- BLANC EM, BRUCE-KELLER AJ, MATTSON MP. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. **J. Neurochem.**, **70**:958-970, 1998.

BLESCH A, GRILL RJ, TUSZYNSKI MH. Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. **Prog. Brain Res.**, **117**:473-84, 1998.

BLÜHER M, MICHAEL M, PERONI OD, UEKI K, KAHN BB, KAHN CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity-related glucose intolerance. **Dev. Cell.**, **3**:25-38, 2002.

BOTHWELL M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, **18**:223-53, 1995.

BROOKS BR, SANJAK M, MITSUMOTO, H. Recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients: phase I-II safety, tolerability and pharmacokinetic studies. **Neurology**, **43(suppl)** A416, 1993.

CAO G, PEI W, GE H, LIANG Q, LUO Y, SHARP FR, LU A, RAN R, GRAHAM SH, CHEN J. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the Tat Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. **J. Neurosci.**, **22(13)**:5423-31, 2002.

CHAO MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci.**, **4(4)**:299-309, 2003.

CURTIS R, ADRYAN KM, ZHU Y, HARKNESS PJ, LINDSAY RM, DISTEFANO PS. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. **Nature**, **365(6443)**:253-5, 1993.

CURTIS R, DISTEFANO PS. Neurotrophic factors, retrograde axonal transport and cell signalling. **Trends in Cell Biol.**, **4**:383-386, 1994.

DALLNER C, WOODS AG, DELLER T, KIRSCH M, HOFMANN HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. **Glia**, **15;37(4)**:374-8, 2002.

DA-SILVA CF, LANGONE F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22(6)**:691-4, 1989.

DAVIS S, ALDRICH TH, IP NY, STAL N, SCHERER S, FARRUGGELLA T, DISTEFANO PS, CURTIS R, PANAYOTatOS N, GASCAN H, CHEVALIER S, YANCOPOULOS GD. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. **Science**, **259**:1736-1739, 1993a.

DAVIS S, ALDRICH TH, STAHL N, PAN L, TAGA T, KISHIMOTO T, IP NY, YANCOPOULOS GD. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. **Science**, **260**:1805-1808, 1993b.

DECKWERTH TL, JOHNSON EM JR. Neurotrophic factor deprivation-induced death. **Ann N Y Acad Sci.**, **679**:121-31, 1993.

- DEROSSI D, JOLIOT AH, CHASSAING G, PROCHIANTZ A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. **J. Biol. Chem.**, **269(14)**:10444-50, 1994.
- DIETZ GPH, BÄHR M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. **Mol. Cell. Neurosci.**, **27**:85-131, 2004
- DiSTEFANO, PS. Neurotrophic factors in the treatment of motor neuron disease and trauma. **Exp Neurol.**, **124(1)**:56-9, 1993.
- DITTRICH F, THOENEN H, SENDTNER M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. **Ann. Neurol.**, **35(2)**:151-63, 1994.
- DOBREA GM, UNNERSTALL JR, RAO MS. The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the rat. **Dev. Brain Res.**, **66**:209-219, 1992.
- DOLCET X, SOLER RM, GOULD TW, EGEA J, OPPENHEIM RW, COMELLA JX. Cytokines promote motoneurons survival through the Janus Kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase pathway. **Mol. Cell Neurosci.**, **18**:619-31, 2001.
- DORNER G, PLAGEMANN A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. **Horm. Metab. Res.**, **26(5)**:213-221, 1994.
- DUBERLEY RM, JOHNSON IP, ANANDP, SWASH M, MARTIN J, LEIGH PN, ZEMAN S. Ciliary neurotrophic factor receptor expression in spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurol. Sci.**, **129 (Suppl)**:109-113, 1995.
- DUFF E, LI L, HAARTZELL DL, CHOI Y-H, DELLA-FERA MA, BAILE CA. Ciliary neurotrophic factor injected icv induces adipose tissue apoptosis in rats. **Apoptosis**, **9**:629-634, 2004.
- ELLIOTT G, O'HARE P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. **Cell**, **88(2)**:223-33, 1997.
- ESPAT NJ, AUFFENBERG T, ROSENBERG JJ, ROGY M, MARTIN D, FANG CH, HASSELGREN PO, COPELAND EM, MOLDAWER LL. Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. **Am. J. Physiol.**, **271**:R185-90, 1996.
- FAWELL S, SEERY J, DAIKH Y, MOORE C, CHEN LL, PEPINSKY B, BARSOUM J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **91(2)**:664-8, 1994.
- FRANKEL AD, PABO CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, **55(6)**:1189-93, 1988.

FRIEDMAN B, SCHERER SS, RUDGE JS, HELGREN M, MORRISEY D, MCCLAIN J, WANG DY, WIEGAND SJ, FURTH ME, LINDSAY RM Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. **Neuron**, **9(2)**:295-305, 1992.

FRIEDMAN B, KLEINFELD D, IP NY, VERGE VM, MOULTON R, BOLAND P, ZLOTCHENKO E, LINDSAY RM, LIU L. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. **J. Neurosci.**, **15(2)**:1044-56, 1995.

FRIEDMAN HC, AGUAYO AJ, BRAY GM. Trophic factors in neuron-Schwann cell interactions. **Ann. N. Y. Acad.Sci.**, **883**:427-38, 1999.

FUNAKOSHI H, FRISEN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM, PERSSON H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, **123(2)**:455-65, 1993.

GEARING DP, ZIEGLER SF, COMEAU MR, FRIEND D, THOMA B, COSMAN D, PARK L, MOSLEY B. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M and ciliary neurotrophic factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:1119-1123, 1994.

GLOAGUEN I, COSTA P, DEMARTIS A, LAZZARO D, DI MARCO A, GRAZIANI R, PAONESSAG, CHEN F, ROSENBLUM CI, VAN DER PLOEG LH, CORTESE R, CILIBERTO G, LAUFER R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94(12)**:6456-61, 1997.

GORDON N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. **Brain Dev.**, **17(1)**:73-7, 1995.

GREEN M, LOEWENSTEIN PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell**, **55(6)**:1179-88, 1988.

GREENSMITH L, VRBOVA G. Motoneurone survival: a functional approach. **Trends Neurosci.**, **19(11)**:450-5, 1996.

HAAS CA, HOFMANN HD, KIRSCH M. Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. **J. Neurobiol.**, **41(4)**:559-71, 1999.

HAASE G, PETTMANN B, BORDET T, VILLA P, VIGNE E, SCHMALBRUCH H, KAHN A. Therapeutic benefit of ciliary neurotrophic factor in progressive motor neuronopathy depends on the route of delivery. **Ann. Neurol.**, **45(3)**:296-304, 1999.

HAGG T, QUON D, HIGAKI J, VARON S. Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. **Neuron**, **8(1)**:145-58, 1992.

HENDERSON JT, SENIUK NA, RICHARDSON PM, GAULDIE J, RODER JC. Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. **J. Clin. Invest.**, **93(6)**:2632-8, 1994a.



HENDERSON JT, SENIUK NA, RODER JC. Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. **Mol. Brain Res.**, **22(1-4)**:151-65, 1994b.

HO A, SCHWARZE SR, MERMELSTEIN SJ, WAKSMAN G, DOWDY SF. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. **Cancer Res.**, **61(2)**:474-7, 2001.

HOLM C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochem. Soc. Trans.**, **31(Pt6)**:1120-1124, 2003.

HUGHES SM, LILLIEN LE, RAFF MC, ROHRER H, SENDTNER M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. **Nature**, **335(6185)**:70-3, 1988.

INOUE M, NAKAYAMA C, NOGUCHI H. Activating mechanism of CNTF and related cytokines. **Mol. Neurobiol.**, **12(3)**:195-209, 1996.

IP NY, MCCLAIN J, BARREZUETA NX, ALDRICH TH, PAN L, LI Y, WIEGAND SJ, FRIEDMAN B, DAVIS S, YANCOPOULOS GD. The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. **Neuron**, **10(1)**:89-102, 1993.

IP NY, WIEGAND SJ, MORSE J, RUDGE JS. Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. **Eur. J. Neurosci.**, **5**:25-33, 1993.

IP NY, YANCOPOULOS GD. Neurotrophic factors and their receptors. **Prog. Brain Res.**, **105**:189-95, 1995.

IP NY, YANCOPOULOS GD. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. **Annu. Rev. Neurosci.**, **19**:491-515, 1996.

JHO DH, ENGELHARD HH, GANDHI R, CHAO J, BABCOCK T, ONG E, ESPART NJ. Ciliary neurotrophic factor upregulates ubiquitin-proteasome components in a rat model of neuronal injury. **Cytokine**, **27**:142-151, 2004.

JIAO J, KAUR N, LU B, REEVES SA, HALVORSEN SW. Initiation and maintenance of CNTF-Jak/Stat signaling in neurons is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors. **Mol. Brain Res.**, **116**:135-46, 2003.

JOHNSON EM Jr, DECKWERTH TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.**, **16**:31-46, 1993.

KAHN MA, ELLISON JA, SPEIGHT GJ, DE VELLIS J. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. **Brain Res.**, **685(1-2)**:55-67, 1995.

KAHN MA, HUANG CJ, CARUSO A, BARRESI R, NAZARIAN R, CONDORELLI DF, DE VELLIS J. Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces

transcriptional expression of glial fibrillary protein in glial cells. **J. Neurochem.**, **68(4)**:1413-1423, 1997.

KASHIHARA Y, KUNO M, MIYATA Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation **J. Physiol.**, **386**:135-48, 1987.

KILIC U, KILIC E, DIETZ GP, BAHR M. Intravenous Tat-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, **34**:1304-1310, 2003.

KIRSCH M, HOFMANN HD. Expression of ciliary neurotrophic factor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. **Neurosci. Lett.**, **180**: 163-166, 1994.

KIRSCH M, TERHEGGEN U, HOFMANN. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. **Mol. Cell. Neurosci.**, **24**:130-138, 2003.

KORSCHING S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. **J. Neurosci.**, **13(7)**:2739-2748, 1993.

KUMAR NM, GILULA NB. The gap junction communication channel. **Cell**, **84**:381-388, 1996.

KUNO M., Target dependence of motoneural survival: the current status. **J. Neurosci. Res.**, **9**, 155-172, 1990.

KUZIS K, ECKENSTEIN FP. Ciliary neurotrophic factor as a motor neuron trophic factor. **Perspect. Dev. Neurobiol.**, **4(1)**:65-74, 1996.

KWON YW, GURNEY ME. Systemic injections of ciliary neurotrophic factor induce sprouting by adult motor neurons. **Neuroreport**, **5(7)**:789-92, 1994.

LAMBERT PD, ANDERSON KD, SLEMAN, WONG V, TAN J, HIJARUNGURU A, CORCORAN TL, MURRAY JD, THABET KE, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **98(8)**:4652-57, 2001.

LANGONE F, REZENDE ACS, ROGÉRIO F, CASTILHO R, PERONI D, SKAPER SD, NEGRO A. Ciliary neurotrophic factor fused with protein transduction domain has neuroprotective action without side effects. **Society for Neuroscience Abstracts**, 944.18, 2004.

LAWSON SJ, LOWRIE MB. The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. **Neuroscience**, **87(2)**:337-48, 1998.

LEE DA, ZURAWEL RH, WINDEBANK AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. **J. Neurochem.**, **65(2)**:564-8, 1995.

LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **118**:149-170, 1964.

LEVI-MONTALCINI R. From Turin to Stockholm via St. Louis and Rio de Janeiro. **Science.**, **287(5454)**:809, 2000.

- LEWIN GR, BARDE YA. Physiology of the neurotrophins. **Annu. Rev. Neurosci.**, **19**:289-317, 1996.
- LI M, SENDTNER M, SMITH A. Essential function of LIF receptor in motor neurons. **Nature**, **378(6558)**:724-7, 1995.
- LILLIEN LE, RAFF MC. Differentiation signals in the CNS: type-2 astrocyte development in vitro as a model system. **Neuron**, **5(2)**:111-9, 1990.
- LILLIEN LE, SENDTNER M, RAFF MC. Extracellular matrix-associated molecules collaborate with ciliary neurotrophic factor to induce type-2 astrocyte development. **J. Cell Biol.**, **111(2)**:635-44, 1990.
- LIN LFH, MISMER D, LILE JD, ARMES LG, BUTLER III ET, VANNICE JL, COLLINS F. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). **Science**, **246(4933)**:1023-5, 1989.
- LIN JH, YANG J, LIU S, TAKANO T, WANG X, GAO Q, WILLECKE K, NEDERGAARD M. Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. **J. Neurosci.**, **23**:430-441, 2003.
- LINDSAY, RM. Specificity, synergy and autocrine roles of the neurotrophins and CNTF. In: LIFE and Death in Nervous System. Eds. Ibáñez CF, Hökfelt T, Olson L, Fuxe K, Jörmvall H, Ottoson D. New York, Pergamon, (Wenner-Gren International Series, v. 67). p.363-378, 1995.
- LINDSAY RM, WIEGAND SJ, ALTAR CA, DISTEFANO PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. **Trends Neurosci.**, **17(5)**:182-90, 1994.
- LISSY NA, VAN DYK LF, BECKER-HAPAK M, VOCERO-AKBANI A, MENDLER JH, DOWDY SF. TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. **Immunity**, **8(1)**:57-65, 1998.
- LOWRIE MB, LAWSON SJ. Cell death of spinal interneurons. **Prog. Neurobiol.**, **61(6)**:543-55, 2000.
- LOWRIE MB, LAVALETTE D, DAVIES CE. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. **Dev. Neurosci.**, **16(5-6)**:279-84, 1994.
- LOWRIE MB, VRBOVA G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.**, **15 (03)**: 80-84, 1992.
- MANTHORPE M, SKAPER SD, WILLIAMS LR, VARON S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. **Brain Res.**, **367(1-2)**:282-6, 1986.
- MARTIN A, HOFMANN HD, KIRSCH M. Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. **J. Neurosci.**, **23(13)**:5416-24, 2003.

MARTIN D, MERKEL E, TUCKER KK, MCMANAMAN JL, ALBERT D, RELTON J, RUSSELL DA. Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, **271**:R1422-8, 1996.

MATTHYS P, BILLIAU A. Cytokines and cachexia. **Nutrition**, **13**(9):763-70, 1997

MILLER RG, BRYAN WW, DIETZ MA. Safety, tolerability and pharmacokinetics of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) **Ann. Neurol.**, **34**:P241, 1993.

MILLER RG, BRYAN WW, DIETZ MA, MUNSAT TL, PETAJAN JH, SMITH SA, GOODPASTURE JC. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, **47**(5):1329-31, 1996.

MILLER RG, PETAJAN JH, BRYAN WW, ARMON C, BAROHN RJ, GOODPASTURE JC, HOAGLAND RJ, PARRY GJ, ROSS MA, STROMATT SC. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. **Ann. Neurol.**, **39**(2):256-60, 1996.

MONVILLE C, COULPIER M, CONTI L, DE-FRAJA C, DREYFUS P, FAGES C, Riche D, Tardy M, Cattaneo E, Peschanski M. Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. **Mol. Cell Neurosci.**, **17**(2):373-84, 2001.

MORIS G, VEGA J. Neurotrophic factors: basis for their clinical applications. **Neurologia**, **18**(1):18-28, 2003.

NAGAHARA H, VOCERO-AKBANI AM, SNYDER EL, HO A, LATHAM DG, LISSY NA, BECKER-HAPAK M, EZHEVSKY SA, DOWDY SF. Transduction of full-length Tat fusion proteins into mammalian cells: Tat-p27Kip1 induces cell migration. **Nat. Med.**, **4**(12):1449-52, 1998.

NAKASE T, FUSHIKI S, NAUS CC. Astrocytic gap junctions composed of connexin reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. **Stroke**, **34**:1987-1993, 2003.

NAUS CC, OZOG MA, BECHBERGER JF, NAKASE T. A neuroprotective role for gap junctions. **Cell Adhes. Commun.**, **8**:325-328, 2001.

NEGRO A, CORONA G, BIGON E, MARTINI I, GRANDI C, SKAPER SD, CALLEGARO L. Synthesis, purification, and characterization of human ciliary neuronotrophic factor from E. coli. **J. Neurosci. Res.**, **29**(2):251-60, 1991a.

NEGRO A, TOLOSANO E, SKAPER SD, MARTINI I, CALLEGARO L, SILENGO L, FIORINI F, ALTRUDA F. Cloning and expression of human ciliary neurotrophic factor. **Eur. J. Biochem.**, **201**(1):289-94, 1991b.

NEUHAUS O, ARCHELOS JJ, HARTUNG HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends Pharmacol. Sci.**, **24**(3):131-8, 2003.

- OLIVEIRA AL, RISLING M, DECKNER M, LINDHOLM T, LANGONE F, CULLHEIM S. Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. **Neuroreport**, **8(13)**:2837-40, 1997.
- OLIVEIRA AL, RISLING M, NEGRO A, LANGONE F, CULLHEIM S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. **J. Comp. Neurol.**, **447(4)**:381-93, 2002.
- OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Ann. Rev. Neurosci.**, **14**, 453-501, 1991.
- OTT V, FASSHAUER M, DALSKI A, KLEIN HH, KLEIN J. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. **J. Endocrinol.**, **173(2)**:R1-8, 2002.
- OZOG MA, BECHBERGER JF, NAUS CC. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFRalpha) increases connexin43 expression and suppresses growth of C6 glioma cells. **Cancer Res.**, **62**:3544-3548, 2002a.
- OZOG MA, SIUSHANSIAN R, NAUS CC. Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **61**:132-141, 2002b.
- OZOG MA, BENIER SM, BATES DC, CHATTERJEE B, LO CW, NAUS CC. The complex of ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. **Mol. Biol. Cell**, **15(11)**:4761-4774, 2004.
- PENN RD, KROIN JS, YORK MM, CEDARBAUM JM. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). **Neurosurgery.**, **40(1)**:94-9, discussion 99-100, 1997.
- PETTMANN B, HENDERSON CE. Neuronal cell death. **Neuron**, **20(4)**:633-47, 1998.
- PRADAT PF. Treatment of peripheral neuropathies with neurotrophic factors: animal models and clinical trials **Rev. Neurol.**, **159(2)**:147-61, 2003.
- RENDE M, HAGG T, MANTHORPE M, VARON S. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in neurons of the normal adult rat spinal cord and its modulation after peripheral nerve lesions. **J. Comp. Neurol.**, **319(2)**:285-98, 1992.
- RICHARDSON PM. Ciliary neurotrophic factor: a review. **Pharmacol. Ther.**, **63(2)**:187-98, 1994.
- RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci.**, **20(12)**:570-7, 1997. Review. Erratum in: **Trends Neurosci.**, **21(2)**:80, 1998.
- RIGGS JE. Trauma, axonal injury, and amyotrophic lateral sclerosis: a clinical correlate of a neuropharmacologic model. **Clin. Neuropharmacol.**, **18(3)**:273-6, 1995.

ROGERIO F, DE SOUZA QUEIROZ L, TEIXEIRA SA, OLIVEIRA AL, DE NUCCI G, LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. **Brain Res.**, **926(1-2)**:33-41, 2002.

ROGERIO F, TEIXEIRA AS, REZENDE ACS, COFIÑO R, QUEIROZ LS, DE NUCCI G, MUSCARÁ MN, LANGONE F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. **Dev. Brain Res.**, **154(2)**: 217-225, 2005.

RUDGE JS, ALDERSON RF, PASNIKOWSKI E, MCCLAIN J, IP NY, LINDSAY RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. **Eur J Neurosci.**, **4(6)**:459-471, 1992.

RUDGE JS, LI Y, PASNIKOWSKI EM, MATTSSON K, PAN L, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ, LINDSAY RM, IP NY. Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. **Eur. J. Neurosci.**, **6**:693-705, 1994.

SALEHI A, DELCROIX JD, MOBLEY WC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. **Trends Neurosci.**, **26(2)**:73-80, 2003.

SCHMALBRUCH H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. **J Comp. Neurol.**, **224**:252-258, 1984.

SCHMALBRUCH H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:315-22, 1987a.

SCHMALBRUCH H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:323-9, 1987b.

SCHMALBRUCH H. The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. **Rev. Neurol.**, **144(11)**:721-9, 1988.

SCHMALBRUCH H. Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. **Muscle Nerve**, **13(5)**:421-32, 1990.

SCHOOLTINK H, STOYAN T, ROEB E, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. **FEBS Lett.**, **314**:280-284, 1992.

SCHWARZE SR, DOWDY SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. **Trends Pharmacol. Sci.**, **21(2)**:45-8, 2000.

SCHWARZE SR, HO A, VOCERO-AKBANI A, DOWDY SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. **Science**, **285(5433)**:1569-72, 1999.

SCHWARZE SR, HRUSKA KA, DOWDY SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? **Trends Cell Biol.**, **10**:290-295, 2000.

- SEMKOVA I, KRIEGLSTEIN J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. **Brain Res. Rev.**, **30(2)**:176-88, 1999.
- SENDTNER M, DITTRICH F, HUGHES RA, THOENEN H. Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. **J. Neurol. Sci.**, **124** (Suppl):77-83, 1994.
- SENDTNER M, GOTZ R, HOLTSMANN B, THOENEN H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. **J. Neurosci.**, **17(18)**:6999-7006, 1997.
- SENDTNER M, HOLTSMANN B, KOLBECK R, THOENEN H, BARDE YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. **Nature**, **360(6406)**:757-9, 1992a.
- SENDTNER M., KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature**, **345**:4401, 1990.
- SENDTNER M, PEI G, BECK M, SCHWEIZER U, WIESE S. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. **Cell Tissue Res.**, **301(1)**:71-84, 2000.
- SENDTNER M, SCHMALBRUCH H, STOCKLI KA, CARROLL P, KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. **Nature**, **358(6386)**:502-4, 1992b.
- SENDTNER M, STOCKLI KA, THOENEN H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J. Cell Biol.**, **118(1)**:139-48, 1992c.
- SIUSHANSIAN R, BECHBERGER JF, CECETTO DF, HACHINSKI VC, NAUS CC. Connexin43 null mutation increases infarct size after stroke. **J. Comp. Neurol.**, **440**:387-394, 2001.
- SLEEMAN MW, ANDERSON KD, LAMBERT PD, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR $\alpha$ . **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, **74**:265-272, 2000.
- SLEEMAN MW, GARCIA K, LIU R, MURRAY JD, MALINOVA L, MONCRIEFFE M, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **100(24)**:14297-14302, 2003.
- SMITH GM, RABINOVSKY ED, MCMANAMAN JL, SHINE HD. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Exp. Neurol.**, **121(2)**:239-47, 1993.
- SNIDER WD, ELLIOT JL, YAN D. Axotomy-induced neuronal death during development. **J. Neurobiol.**, **23**:1231-1246, 1992.

- STAHL N, YANCOPOULOS GD. The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. **J. Neurobiol.**, **25(11)**:1454-66, 1994.
- STÖCKLI KA, LILLIEN LE, NAHER-NOE M, BREITFELD G, HUGHES RA, RAFF MC, THOENEN H, SENDTNER M. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. **J. Cell Biol.**, **115(2)**:447-59, 1991.
- STOCKLI KA, LOTTSPREICH F, SENDTNER M, MASIAKOWSKI P, CARROLL P, GOTZ R, LINDHOLM D, THOENEN H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. **Nature**, **342(6252)**:920-3, 1989.
- TAN SA, DEGLON N, ZURN AD, BAETGE EE, BAMBER B, KATO AC, AEBISCHER P. Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. **Cell Transplant.**, **5(5)**:577-87, 1996.
- THOENEN H. The changing scene of neurotrophic factors. **Trends Neurosci.**, **14(5)**:165-70, 1991.
- ULENKATE HJLM, GISPEN WHG, JENNEKENS FGI. Effects of ciliary neurotrophic factor on retrograde cell reaction after facial nerve crush in young adult rats. **Brain Res.**, **717**:29-37, 1996.
- VANTINI G, SKAPER SD. Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology? **Pharmacol. Res.**, **26(1)**:1-15, 1992.
- VARON S, MANTHORPE M, ADLER R. Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. **Brain Res.**, **173(1)**:29-45, 1979.
- VEJSADA R, SAGOT Y, KATO AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. **Eur. J. Neurosci.**, **7(1)**:108-15, 1995.
- VERGANI L, DI GIULIO AM, LOSA M, ROSSONI G, MULLER EE, GORIO A. Systemic administration of insulin-like growth factor decrease motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. **J. Neurosci. Res.**, **54**:840-847, 1998.
- WADT KAW, LARSEN CM, ANDERSEN HU, NIELSEN K, KARLSEN AE, MANDRUP-POULSEN T. ciliary neurotrophic factor potentiates the  $\beta$ -cell inhibitory effect of IL-1 $\beta$  in rat pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. **Diabetes**, **47**:1602-1608, 1998.
- WHITESIDE G, DOYLE CA, HUNT SP, MUNGLANI R. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. **Eur. J. Neurosci.**, **10(11)**:3400-8, 1998.
- WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG HM, LARSEN PR. Williams Textbook of Endocrinology. Ed. W.B. Saunders Company, 9<sup>a</sup> ed., p.973-1153, 1998.
- WINTER CG, SAOTOME Y, LEVISON SW, HIRSH D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **92(13)**:5865-9, 1995.



- XU B, DUBE MG, KALRA PS, FARMERIE WG, KAIBARA A, MOLDAWER LL, MARTIN D, KALRA SP. Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotrophic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. **Endocrinology**, **139**(2):466-73, 1998.
- YAN Q, ELLIOTT JL, MATHESON C, SUN J, ZHANG L, MU X, REX KL, SNIDER WD. Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. **J. Neurobiol.**, **24**(12):1555-77, 1993.
- YAN Q, ELLIOTT J, SNIDER WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. **Nature**, **360**(6406):753-5, 1992.
- YE J, CAO L, CUI R, HUANG A, YAN Z, LU C, HE C. The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. **Brain Res.**, **997**(1):30-9, 2004.
- YUAN Q, WU W, SO KF, CHEUNG AL, PREVETTE DM, OPPENHEIM RW. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats. **Neuroreport**, **11**(10):2237, 2000.
- ZHANG F, RICHARDSON PM, HOLLAND DP, GUO Q, TATTON WG. CNTF or (-)-deprenyl in immature rats: survival of axotomized facial motoneurons and weight loss. **J. Neurosci. Res.**, **40**(4):564-70, 1995.
- ZVONIC S, CORNELIUS P, STEWART WC, MYNATT RL, STEPHENS JM. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. **J. Biol. Chem.**, **278**(4):2228-35, 2003.